

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilian-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

Multimodale Therapie zur Hemmung der Tumorzellinvasion

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Diana Segmiller

aus Craiova
2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Frau PD Dr. Pamela Zengel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn Prof. Dr. Peter Bartenstein
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Frau Dr. Suna Schmitz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	11.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	5
1.1 Allgemein.....	5
1.1.1 Cervixkarzinom	7
1.1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf- Hals-Bereiches	10
1.2 Tumorneoangiogenese und Metastasierung.....	14
1.2.1 Schlüsselfaktoren der Tumorigenese und Tumorinvasion.....	16
1.2.1.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) / VEGF - Rezeptor - System	16
1.2.1.2 Matrixmetalloproteinasen (MMP`s).....	17
1.2.1.3 Cyclooxygenase (COX) - Expression	18
1.2.1.4 Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPA) - System	20
1.2.2 Antiangiogene und antimetastasierende Therapieansätze.....	21
1.3 Zielsetzung.....	22
2 Materialien und Methoden	24
2.1 MATERIAL	24
2.1.1 Antikörper	24
2.1.2 Chemikalien, Geräte und Sonstiges.....	25
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellen.....	28
2.2.1.1 Etablierte Zelllinien	28
2.2.1.2 Zellkultur.....	28
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	29
2.2.2 Durchflußzytometrie (FACS-Analysen)	30
2.2.2.1 Prinzip:	30
2.2.2.2 Antikörper.....	30
2.2.2.3 Methode extrazelluläres FACS.....	30
2.2.3 MTT- Assay (Bestimmung der Zellviabilität).....	31
2.2.3.1 Prinzip:	31
2.2.3.2 Methode	31
2.2.4 Tumorzell-Sphäroide.....	32
2.2.4.1 Prinzip	32
2.2.4.2 Methode	32
2.2.4.3 Einbettung und Verarbeitung von Sphäroiden	32
2.2.4.4 Hämatoxylin – Eosin – Färbung	33
2.2.4.5 Immunhistochemische Färbungen.....	33
2.2.4.6 Mikrofotografische Dokumentation	34
2.2.5 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.5.1 Prinzip	34
2.2.5.2 Methode	35
2.2.6 Migrations- und Invasionsversuche.....	36
2.2.6.1 Migration	36
2.2.6.2 Invasion.....	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP) in HeLa- und FaDu - Zellen	38

3.2 COX 2 Expression in Cervixkarzinom- (HeLa) und Hypopharynxkarzinom-Zellen (FaDu)	40
3.3 Einfluss von Celecoxib, Galardin, WX-UK1 (D und L Form) auf die Vitalität der HeLa, FaDu und Fibroblasten-Zellen (MTT-Assay)	41
3.4 Migration.....	46
3.5 Invasion.....	48
3.5.1 Invasion von HeLa und FaDu Zellen im Sphäroidmodell.....	48
3.5.2 Invasion von HeLa und FaDu Zellen im Matrigelmodell	57
4 Diskussion	61
4.1 Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP) in HeLa- und FaDu - Zellen	62
4.2 COX 2 - Expression in Cervixkarzinom- (HeLa) und Hypopharynxkarzinom-Zellen (FaDu)	63
4.3 Einfluss von Celecoxib, Galardin, WX-UK1 (D und L Form) auf die Vitalität der HeLa, FaDu und Fibroblasten-Zellen (MTT-Assay)	64
4.4 Migration.....	65
4.5 Invasion.....	66
4.5.1 Charakterisierung des Invasionsverhalten von Tumorzellen in Sphäroid- und Matrigelmodell in Anwesenheit von Medikamenten	66
5 Zusammenfassung.....	69
6 Literaturverzeichnis	71
7 Abkürzungsverzeichnis	77
8 Danksagung.....	78
9 Eidesstattliche Versicherung	80

1 Einleitung:

1.1 Allgemein

Nach Angaben von UICC erhalten derzeit jedes Jahr mehr als 12 Millionen Menschen weltweit die Diagnose Krebs und 7,6 Millionen sterben an einer Krebserkrankung. Die Tendenz ist steigend; Experten schätzen, dass im Jahr 2030 jährlich weltweit rund 26 Millionen Menschen an Krebs erkranken und 17 Millionen Menschen daran sterben werden. Vor allem demografische Faktoren, wie die steigende Lebenserwartung und das Bevölkerungswachstum, sind als Gründe für diese Entwicklung zu sehen (Arends und Unger).

Die relative 5-Jahresüberlebensrate beträgt, unter Einbeziehung der Daten aus acht Bundesländern für Patienten die 2007 und 2008 erkrankten, für alle Krebsarten bei Frauen 64% und bei Männern 59% (Saarländisches Krebsregister, 2012).

Die Entstehung von Tumoren ist ein schrittweiser Vorgang mit kumulativer Anhäufung von Genmutationen, welche zu einer Aktivierung der Onkogene und Inaktivierung der Tumor-Suppressorgene führt (C.Rüegg, 2002).

Dem heutigen Wissensstand gemäß muss meist von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen werden, bei der Umwelteinflüsse (Viren, Strahlen), Ernährung, genetische, immunologische und endokrine Faktoren auf die Tumorentstehung und das Wachstum einwirken (Herold et al., 2004).

Unter den chemischen Faktoren ist Rauchen bei weitem das wichtigste Karzinogen. In Westeuropa ist Rauchen für 25-30% der menschlichen Krebserkrankungen verantwortlich. Allein in Deutschland sterben jedes Jahr etwa 50 000 Menschen an den Folgen. Ein ähnlich großer Anteil (20-40%) der Todesfälle durch Krebs ist auf falsche Ernährungsweise zurückzuführen. Viele Karzinome des Kolons, des Rektums, der weiblichen Brust und der Ovarien gehen auf eine zu kalorienreiche und ballaststoffarme Ernährung zurück. Den Anteil der Tumore, die durch chronische Infektionen verursacht werden, schätzt man weltweit auf 15%. Zu den wichtigsten Erregern zählen *Helicobacter Pylori* und die Hepatitis-B- und C-Viren sowie Humane Papilloma Viren, die zu Cervix-, Vulva-, Oropharynx- und Analkarzinomen führen können. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von Krebserkrankungen sind erhöhter Alkoholenuss, Umwelteinflüsse (Sonneneinstrahlung) und Gefahrenstoffe am Arbeitsplatz (Bertz et al., 2004).

Da die Ursachen der Krebsentstehung komplex sind und nahezu jeder Tumor ein individuelles Problem darstellt, erweist sich die Tumorbekämpfung als besonders schwierig.

Die Behandlung von Tumoren erfolgt überwiegend mit den klassischen Methoden: chirurgische Tumorentfernung, Chemotherapie und die Strahlentherapie. Insbesondere in der Behandlung von bereits metastasierten Tumoren stellt die medikamentöse antineoplastische Therapie eine gute Option dar; sie kann im adjuvanten oder palliativen Therapieansatz eingesetzt werden. Aufgrund der antiproliferativen Wirkungen auch an normalen Zellen sind aber die Strahlentherapie und die zytostatische Chemotherapie mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden.

1.1.1 Cervixkarzinom

Epidemiologie:

Bei dem Cervixkarzinom handelt es sich um den 12. häufigsten bösartigen Tumor der Frau mit fast einer halben Million Neuerkrankungen pro Jahr. Etwa 266.000 Frauen starben im Jahr 2012 weltweit an dieser Erkrankung.

In Deutschland steht das Cervixkarzinom mittlerweile an achter Stelle in der Rangfolge der Inzidenz mit 14,1 Erkrankungen pro 100.000 (Deutsche Krebsgesellschaft und deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Diagnostik und Therapie des Cervixkarzinoms, 2008).

Trotz Vorsorgeprogramm wird jährlich in Deutschland diese Krebsart bei rund 7500 Frauen diagnostiziert und etwa 1700 sterben jährlich daran (Statistisches Bundesamt für die Bundesrepublik Deutschland 2008).

Die Inzidenz des Cervixkarzinoms ist in Deutschland, gemessen an den Zahlen des Saarlandes, von 40,0:100000 1971 auf 14,1:100000 2004 zurückgegangen und die Mortalität von 8,0:100000 auf 4,6:100000 abgefallen. Im Vergleich zum Cervixkarzinom liegt die Inzidenz der cervicalen Präkanzerosen um das 100-fache höher. Damit dürfte in Deutschland die Inzidenz schwergradiger Präkanzerosen der Cervix uteri bei ca. 1% liegen.

Die Prognose der invasiven Karzinome blieb während der letzten Jahrzehnte nahezu unverändert. Unabhängig vom Stadium haben Patientinnen mit negativen Lymphknoten eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90%, bei positivem Lymphknotenbefall nur zwischen 20 und 60%.

Die Altersverteilung: Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 52,2 Jahren. Die Altersverteilung zeigt einen ersten Gipfel zwischen 35 und 54 Jahren sowie einen weiteren ab 65 Jahren.

Das mittlere Alter bei der Erstdiagnose des Cervixkarzinoms hat sich in den letzten 25 Jahren um 14 Jahre verringert.

Das Cervixkarzinom entwickelt sich mit einer Latenzzeit von bis zu 10 Jahren über präinvasive Vorstufen.

Unbehandelt geht die leichte Dysplasie der Portio Uteri (CIN 1) in 11% in ein Carcinoma in situ (CIN 3) und in 1% in ein invasives Karzinom über. Die Progressionsrate der CIN 3 zu einem invasiven Karzinom liegt zeitabhängig zwischen 30-70%.

Das verhornende (squamöse) oder nicht verhornende Plattenepithelkarzinom sowie das Adeno- oder adenosquamöse Karzinom sind die häufigsten histologischen Typen. Bei ca. 80% der Fälle liegt aber ein Plattenepithelkarzinom vor.

Ätiologisch, stellt die Infektion mit so genannten Hochrisiko-Typen Humaner Papilloma Viren (HPV) eine Voraussetzung für die Entstehung des Cervixkarzinoms dar. So konnte man in 99,8% der Fälle mit invasiven Plattenepithelcarzinom der Cervix die HPV-DNA mithilfe der molekularbiologischen Verfahren nachweisen. Zu den Hochrisiko - Typen zählen HPV 16, 18, 33, 45, 51, 52 und 56. HPV 6 und 11 verursachen mehr als 90 Prozent der Genitalwarzen. Kofaktoren der Tumorentstehung sind die Langzeiteinnahme von oralen Kontrazeptiva, die Zahl der Geburten oder eine erworbene Immunschwäche. Als weitere Tumorpromotoren werden das Rauchen sowie Genitalinfektionen, mit unterschiedlichsten Erregern diskutiert (Beckmann et. al., Deutsches Ärzteblatt von 08.04.2005, Therapiefortschritte beim primären Cervixkarzinom).

Die Stadieneinteilung des Cervixkarzinoms erfolgt nach der Übereinkunft der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) klinisch-diagnostisch, entsprechend der TNM-Klassifikation: Grösse (T1-4), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M), wobei diese auf histopathologisch gesicherten Befunde basieren. Das biologische Bild wird im Grading (G1-4) eingeteilt.

Behandlung:

Derzeit wird die Wirkung verschiedenen Impfstoffs gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 untersucht. Die Vakzine ähneln dem Hepatitis-B-Impfstoff und bestehen aus dem L1-Kapsid-Protein der Papillomaviren. In Deutschland stehen nun zwei Impfstoffe zum Schutz vor einer HPV-Infektion zur Verfügung: Gardasil® und Cervarix®. Während Gardasil® seit Herbst 2006 in Deutschland verfügbar ist, erfolgte die Zulassung von Cervarix® im September 2007. Die Impfstoffe verhindern die Ansteckung mit den beiden HPV-Typen 16 und 18, die für die Mehrzahl der Cervixkarzinome und einige selteneren Tumorerkrankungen verantwortlich sind. Gardasil® schützt darüber hinaus vor einer Infektion mit den Virustypen HPV 6 und 11 und beugt so zusätzlich gutartigen Genitalwarzen (Condylome) vor. Offiziell empfohlen ist die HPV-Impfung in Deutschland seit März 2007 für Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren (Epidemiologisches Bulletin,

Robert Koch Institut, Impfung gegen Humane Papilloma Viren für Mädchen von 12 bis 17 Jahren, März 2007).

Bei den Vor- und Frühstadien des Cervixkarzinoms ist die Konisation diagnostische und gleichzeitig therapeutische Maßnahme.

In weiter fortgeschrittenen Stadien und wenn Veränderungen der Gebärmutter hinzukommen, muss die Gebärmutter entfernt werden (Hysterektomie).

In den Stadien Ia-IIb ist die Bestrahlung einer Operation gleichwertig, als sogenannte intrakavitäre Bestrahlung. Bei Lymphknotenmetasen oder Fernmetastasen ist eine kombinierte Radiochemotherapie die Therapie der Wahl.

Die 5-Jahres Überlebensrate des Cervixkarzinoms liegt bei 65%. Die Prognose liegt im Stadium I zwischen 70% und 95%, Stadium II 50-70%, Stadium III bei 35% und Stadium IV bei 10% (saarländisches Krebsregister, 2012).

Eine Kombination der operativen- mit der adjuvanten Radio- oder Radio-Chemo-Therapie ist zwar mit einer Verbesserung des Überlebens verbunden, aber auch mit einer deutlichen Erhöhung der Morbidität.

Hier gilt es künftig neue Präventions- und Therapiestrategien zu entwickeln. Ziel muss es sein, bei maximaler Lebensqualität das bestmögliche Therapieergebnis zu erreichen.

1.1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf- Hals-Bereiches

Zu den Kopf- und Halskarzinomen gehören Karzinome der Zunge, des Mundes, der Speicheldrüsen, des Rachens, des Kehlkopfs (Larynx), der Nasennebenhöhlen, des Pharynx mit Oropharynx, des Hypopharynx und des Laryngopharynx und des Ösophagus.

Epidemiologie:

Die Häufigkeit der Tumoren des HNO- Bereiches beträgt weltweit etwa 6 % aller Tumoren, die jährliche Mortalität etwa 6/100.000. Die Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. (DGHNO KHC) berichtete auf der 83. Jahresversammlung (2012) in Mainz dass jedes Jahr weltweit rund 650.000 Menschen neu an einem bösartigen Kopf-Hals-Tumor erkranken.

Während früher das Verhältnis Mann/Frau etwa 7:1 betrug, kam es aufgrund des vermehrten Nikotinkonsums der Frauen zu einer Zunahme der Inzidenz bei Frauen, so dass nun bereits jeder 3. oder 4. Patient mit einem HNO-Tumor weiblich ist. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 50.-70. Lebensjahr.

Für die Bundesrepublik Deutschland ergibt sich aus Daten der Krebsregister eine jährliche Neuerkrankungsrate von mehr als 18.000 bösartigen Kopf-Halsgeschwülsten (Krebs in Deutschland, Häufigkeit und Trends, 2008).

Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung der HNO-Karzinomen sind der chronische Nikotin- und Alkoholabusus (Alkohol 5fach erhöhtes Risiko, Tabak 20fach erhöhtes Risiko). Beide Genussmittel können sich in ihrem karzinogenen Effekt gegenseitig verstärken (50fach erhöhtem Erkrankungsrisiko, Rodriges et al.,2004). Mangelnde Mundhygiene und damit verbundene Mundschleimhautirritationen, chronische Holzstaubinhalation oder verstärkte Nickel-Exposition können als weitere Risikofaktoren für Tumore des oberen Aerodigestivtraktes genannt werden.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit gewissen Untergruppen von HPV, insbesondere mit den Typen 16 und 18, bei der Entstehung mancher Kopf- und Halstumoren eine Rolle spielen. Die Häufigkeit von HPV in Kopf- und Halstumoren reicht in der Literatur von 11% bis 44%, wobei die meisten Arbeiten eine Häufigkeit von ungefähr 20-25% berichten. Allerdings gelingt der Nachweis von HPV in wesentlich höherem Maße in Tumoren des Oropharynx (13-57%), insbesondere in der Tonsille (21-100%) und des Zungengrundes (Chaturvedi et. al.,2011).

Prognose:

Die Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes sind in 90% der Fälle Plattenepithelkarzinome (Gath et al., 1999).

Leider werden die meisten bösartigen Neubildungen im HNO-Bereich erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt, wodurch die Prognose ungünstig ist. Die Prognose von malignen Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich steht mit dem Tumorstadium und dem Ausmaß der lokoregionären und generalisierten Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Zusammenhang. Die Therapieerfolge sind auch abhängig von der Lokalisation des Tumors. Die beste Prognose haben Tumoren des Kehlkopfes, dann folgen Tumore des Mundbodens. Die schlechteste Prognose haben Tumore des Rachens, da diese erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden. 50-60% der Patienten entwickeln nach der Erstbehandlung ein lokoregionäres Rezidiv, und in bis zu 20% treten Fernmetastasen auf (Argiris A. et al., Lancet 2008).

Therapie:

Die Therapie bei HNO-Tumoren orientiert sich am Tumorstadium. In frühen Stadien steht die Tumoresektion in Kombination mit einer Neck dissection im Vordergrund, in inoperablen bzw. fortgeschrittenen Stadien wird eine Radiochemotherapie als State of the Art angesehen, im Rezidiv bzw. bei Fernmetastasen kommt vor allem eine palliative Chemotherapie in Frage. Aus der Vielzahl der Chemotherapeutika finden bei HNO-Tumoren vor allem die Substanzen Cisplatin bzw. Carboplatin, 5- Fluorouracil, Methotrexat und die Taxane (Paclitaxel und Docetaxel) eine breite klinische Anwendung. Da auch die Kombination dieser Methoden zu keiner verbesserter Prognose führte, wird seit einigen Jahren nach neuen und effektiveren Wegen in der Diagnostik und Therapie gesucht.

Neue Therapieverfahren wie endoskopische transorale Laserchirurgie, interstitielle Laserthermotherapie, photodynamische Lasertherapie und die Immuntherapie wurden in den letzten Jahren als adjuvante, alternative Therapieformen entwickelt.

Hier wurden in den vergangenen Jahren beachtliche Fortschritte beobachtet, die einerseits durch eine effektivere Chemotherapie aber auch durch die Einführung der Antikörpertherapie möglich wurden.

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die von verschiedenartigsten Zellen synthetisiert und sezerniert werden, an spezifische membranständige Glykoprotein-Rezeptoren binden und je nach Zielzelle unterschiedliche phänotypische Veränderungen hervorrufen können. Aufgrund der Frequenz und Intensität der EGFR Expression und in Hinblick auf

seine Bedeutung für Entwicklung und Erhaltung des malignen Phänotyps bietet sich der Rezeptor als potenzieller Angriffspunkt für eine antitumorale Therapie an.

Spätestens seit der Metaanalyse von Pignon et al. (Lancet, 2000), welche eine signifikante Überlegenheit einer Radiochemotherapie hinsichtlich rezidivfreier Zeit und Gesamtüberleben im Vergleich zu einer alleinigen Radiotherapie gezeigt hat, gilt simultane Verabreichung einer zytostatischen Chemotherapie parallel zur Radiotherapie als Goldstandard, wobei Cisplatin als Chemotherapie der ersten Wahl gilt. Andere Zytostatika, die häufig konkomitent eingesetzt werden sind Mitomycin C und 5-FU. Dem signifikanten Benefiz hinsichtlich Gesamtüberleben und lokaler Tumorkontrolle durch die RCT stehen jedoch gravierende Nebenwirkungen wie Mukositis und schwere Hautreaktionen gegenüber. In einer ersten randomisierten Studie konnten Bonner et al (NEJM 2006) zeigen, dass die konkomitente Verabreichung des Antikörpers Cetuximab zur primären Radiotherapie zu keiner Steigerung der radiogenen Nebenwirkungen führt und lediglich die -für eine anti-EGFR Therapie typische- akneforme Hautreaktion verursacht. Cetuximab in Kombination mit einer Radiotherapie war einer alleinigen Radiotherapie hoch signifikant überlegen und führte zu einem Überlebensbenefiz von 20 Monaten (Bonner et al., NEJM 2006).

Cetuximab und Radiotherapie stellt dann eine Alternative zur simultanen Radio-Chemotherapie dar, wenn aufgrund des Alters des Patienten oder der Nierenfunktion auf die Chemotherapie verzichtet werden muss. Die Ergebnisse einer vergleichenden Studie, sprich Cetuximab und Radiotherapie vs. simultane Radio-Chemotherapie, stehen noch aus.

Eine weitere hochaktuelle, randomisierte Multicenter-Phase-III-Studie (EXTREME-Studie) von der Gruppe um J. B. Vermorken zeigte, dass bei rezidivierenden und/oder metastasierten Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich die zusätzliche Gabe von Cetuximab zu einer Platinhaltigen Chemotherapie das mediane Überleben um 2,7 Monate auf 10,1 Monate steigern kann. Dies ist die erste systemische Therapie in den letzten 25 Jahren, die einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der alleinigen platinhaltigen Chemotherapie bei diesem fortgeschrittenen Tumorstadium zeigt.

Laut einer randomisierten Phase-III-Studie (2011) zur akzelerierten Bestrahlung plus Cisplatin, mit oder ohne Cetuximab, für das Plattenepithelkarzinom Stadium III und IV im HNO-Bereich, verbessert Cetuximab zusätzlich zur Bestrahlung und Cisplatin nicht das progressionsfreien Intervall, verursacht mehr Mukositis und mehr Hauttoxizität (K.K. Ang, Q. Zhang et.al., 2011)

Die antivaskulären Therapieverfahren haben in der letzten Zeit an Bedeutung zugenommen. Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße, ist ein entscheidender Schritt bei der Progression und Metastasierung von HNO-Tumoren. Während konventionelle Therapiekonzepte, z.B. die Chemotherapie und die Bestrahlung, vor allem auf die Tumorzellen selbst abzielen, richtet sich ein antivaskulärer Therapieansatz auf die, den tumorversorgenden Blutgefäße.

Antivaskuläre Therapiestrategien können in Antiangiogenese und das sogenannte Vascular Targeting unterteilt werden.

Das Prinzip der antiangiogenetischen Therapie beruht darauf, möglichst spezifisch das Wachstum angiogenetischer Gefäße, in soliden Tumoren und dessen Metastasen zu hemmen. Das Ziel des Vascular Targeting ist es, selektiv und effektiv das bereits bestehende Tumorgefäßsystem zu zerstören.

Durch die prophylaktische Gabe einer gut verträglichen antivaskulären Therapie kann in Zukunft möglicherweise die Häufigkeit von Rezidiven, Metastasen oder Zweittumoren bei Patienten mit HNO-Karzinomen reduziert werden.

1.2 Tumorneoangiogenese und Metastasierung

Die Morbidität und Letalität von Krebspatienten wird in erster Linie durch die Tumorzellinvasion in das umgebende Gewebe und die Metastasierung der Krebszellen in entfernte Organe beeinflusst. Durch die Invasion überqueren die Tumorzellen anatomische Barrieren wie z.B. Basalmembranen, interstitielles Stroma und Interzellularbrücken (Mignatti et al., 1993).

Algire et al. entdeckten 1945, dass das Wachstum von Tumoren abhängig von der Entwicklung einer schnellen vaskulären Versorgung ist, denn ohne ständige Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen gingen die Tumoren zugrunde. Ab einem Gewebedurchmesser von $2\text{-}3\text{mm}^3$ kann ein Tumor nicht mehr durch reine Diffusion versorgt werden, deshalb sprießen in einem Prozess, den man als Neoangiogenese bezeichnet, Kapillaren in den Tumor ein, um so die nutritive Versorgung zu gewährleisten.

Die Neubildung von Blutgefäßen ist ein natürlicher Prozess. Jedoch findet die Angiogenese beim Menschen nur bei der Organregeneration, der Wundheilung, oder während der Aufbauphase des Endometriums statt. Eine pathologisch gesteigerte Angiogenese wird neben Tumorerkrankungen im Rahmen von chronisch entzündlichen Prozessen und Gefäßveränderungen bei Diabetikern beobachtet (Martin et al., 2003). Für das Krebswachstum jedoch kommt diesem Mechanismus eine besondere Bedeutung zu (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Risan, 1997): die bösartigen Zellen senden Botenstoffe aus, um die bestehenden Blutbahnen anzuregen und neue Gefäße zu bilden. Diesen Vorgang nennt man Tumorangiogenese. Die Wände der Blutgefäße sind mit Endothelzellen ausgekleidet, die verantwortlich sind für die Bildung der neuen Blutbahnen. Bei der Entstehung von neuen Adern sprießen die Endothelzellen aus vorhandenen Gefäßen aus und wachsen als rohrförmige Öffnung in den Tumor hinein. Diese Verbindung wird von spezialisierten Eiweißstoffen übernommen, jene Proteine, die als Zelladhäsionsmoleküle bezeichnet werden. Sie sitzen an der Oberfläche der Endothelzellen und sind in der Lage die Blutgefäße zu einem funktionstüchtigen Versorgungssystem zu vernetzen. Verbinden sie sich mit anderen Zellen, bildet sich ein neues Gefäßnetz im Tumor, über das die Krebszellen an das Blutsystem des Körpers angebunden sind und mit den notwendigen Nährstoffen versorgt werden.

Viele Tumorzellen produzieren bestimmte Eiweißstoffe, sogenannte Wachstumsfaktoren, die das Gefäßwachstum stimulieren. Neben dem Epithelialen Wachstumsfaktor (EGF), Interleukin 8, Prostaglandine E1 und E2, Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha, G-CSF sind v.a.

Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF, fibroblast growth factor) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF, vascular endothelial growth factor) hervorzuheben (Aggarwal, Meenakshi, 2010).

Auch eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase 2 (COX 2), Matrixmetalloproteasen (MMP) und dem urokinase-Plasminogen Aktivator System korreliert mit zunehmender Malignität und schlechter Prognose (Chen, 2000, S.648; Mandriotta, 1995, S.9709).

1.2.1 Schlüsselfaktoren der Tumorigenese und Tumorinvasion

1.2.1.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) / VEGF - Rezeptor – System

Bereits 1970 identifizierte Judah Folkman einen der wichtigsten, potenten und spezifischen Angiogenese-stimulierende Faktoren, den VEGF (Ferrara, 2000). Das von den Tumorzellen gebildete VEGF bindet an VEGF-Rezeptoren auf den Endothelzellen bereits bestehender Blutgefäße (Folkman und Shung, 1992) oder stimuliert die Differenzierung der im Blut zirkulierenden Vorläufer von Endothelzellen (EPC, endothelial progenitor cells) aus dem Knochenmark am Ort der Angiogenese zu reifen (Asahara et. al., 1999; Schatteman et.al., 2000; Rüegg). Die VEGF- Rezeptor assoziierte Tyrosinkinase wird aktiviert und intrazellulär eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Unter anderem kommt es zur Expression von Metalloproteasen und der urokinase-Plasminogen Aktivator System-Komponente, woraufhin sich die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran auflösen. Die Durchlässigkeit der Kapillarenerhöht sich, Endothelzellen proliferieren und wandern in Richtung des Tumors, der die Angiogenese-stimulierenden Faktoren freisetzt (Ferrara, 2002). Es bilden sich neue Kapillaren von ungeordneter, korkenzieherartiger Struktur, die den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoffen versorgen (Journal Onkologie, Prinzip der Angiogenese, 2005).

Durch diese Stimulierung des Gefäßwachstums, ist es einem Tumor überhaupt erst möglich, eine Größe von mehr als wenigen Millimetern zu überschreiten. Eine ausreichende Versorgung mit Blutgefäßen ist in der Regel die Voraussetzung dafür, dass der Tumor über die Blutbahn metastasieren kann. Die Metastasen bestimmen in vielen Fällen die Prognose der Patienten (Wollenberg et al., 1994).

1.2.1.2 Matrixmetalloproteinasen (MMP's)

Die lebensnotwendige strukturierte Anordnung von Zellen in verschiedenen Geweben erfolgt durch ihre Verankerung in der Extrazellulärmatrix (ECM). Matrixmetalloproteinasen (MMP's) umfassen eine Gruppe von mehr als 21 Zink-abhängigen Endopeptidasen, die in der Lage sind sowohl Bestandteile der ECM als auch Oberflächenproteine der Zellen abzubauen. Diese Enzyme, welche als Zymogene sezerniert sind, werden in drei Subklassen unterteilt: Interstitielle Kollagenasen, Typ IV Kollagenasen (Gelatinasen) und Stromelysine. Insgesamt kommt es durch Aktivierung dieser Enzyme zum Abbau der Collagentypen IV, V, VII, IX und X, welche Hauptkomponenten der Basalmembran darstellen (Schwarz 1996, Stracke 1994). Es wurde postuliert, dass eine gesteigerte Expression dieser Matrixmetalloproteinasen ein erhöhtes metastatisches Potential der Tumorzellen bewirkt (Kohn 1995).

Die Degradierung der die Gefäße umgebenden ECM durch MMP's ist die Voraussetzung für den Start der Tumorangiogenese und damit für die Progression von malignem Gewebe. Ihre physiologischen Gewebeinhibitoren sind die TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases). Die Balance zwischen den MMPs und den TIMP bestimmen den Grad der lokalen Proteolyse.

Die meisten der MMPs werden von unterschiedlichen Zellen des Bindegewebes wie Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, aber auch durch Entzündungszellen wie Makrophagen, Neutrophile, Lyphozyten und durch Tumorzellen sezerniert.

Die Expression von MMP-1, -2, -9, -10 und -13 konnte bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen werden (Thale, Koch et.al.,2004).

1.2.1.3 Cyclooxygenase (COX) - Expression

Die Cyclooxygenase ist ein intrazelluläres Enzym der Prostaglandinsynthese und spielt somit eine entscheidende Rolle bei multiplen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.

Es gibt mindestens drei Unterformen der Cyclooxygenase, die als COX-1, COX-2 und COX-3 bezeichnet werden. Schon seit Anfang der 90-er Jahre sind die Isoformen COX-1 und -2 bekannt (Xie et al.1991). Bei den beiden Isoformen 1 und 2 der Cyclooxygenase – Enzyme handelt es sich um Homodimere mit einer ähnlichen Struktur und katalytischen Aktivität. Die Enzyme sind membranständig an der inneren Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums und an den Kernmembranen gelegen. Sie werden von verschiedenen Genen kodiert und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und Expressionsregulation. COX-1 wird konstitutiv unter anderem in Niere, Magen, Thrombozyten und Gefäßendothel exprimiert. Die COX-1 generiert vasodilatierende Prostaglandine, welche den renalen Blutfluß sowie die Mikrozirkulation in der Magenschleimhaut bei systemischer Vasokonstriktion aufrechterhalten (Marnett,1992). Die Bildung von Tromboxan A₂ durch aktivierte Thrombozyten fördert deren Aggregation und wirkt gefäßverengend. Cyclooxygenasen sind Schlüsselenzyme bei der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen.

Die COX-2 wird in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert sondern kann durch Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren induziert werden (T. Koki et al. 2002). Eine konstitutive Expression der COX-2 findet sich in Gehirn, Hoden und Makula densa der Nieren (DeWitt et Smith, 1995).

COX-2 wird in vielen prämaligen Läsionen (z.B kolorektale Polypen, familiäre adenomatöse Poliposis, Barrett Ösophagus, bronchiale Metaplasien und orale Leukoplakien) und Krebsarten hochreguliert (Virchows Arch 2002; Exp Mol Pathol 2010). Ein anderer wichtiger Mechanismus von COX-2 in der Karzinogenese ist die Inhibierung der Apoptose, wodurch das Zellwachstum unterstützt wird. COX-2 fördert die Tumorangienese dadurch, dass es die Produktion von VEGF induziert. COX-Hemmer reduzieren die Migration und Adhäsion von malignen Zellen, sowie die Invasivität von Tumoren und die Tumorangienese (Rozic, Chakraborty et al.2001,Cao and Prescott 2002, Lin, Subbaramaiah et al.2002).

Dass die COX-2 Inhibitoren antineoplastische Wirkungen besitzen, wurde auch in klinischen Studien gezeigt. Sie inhibieren das Tumorwachstum, verbessern gleichzeitig

die Prognose von Tumorpatienten (Baron and Sandler, 2000) und das Ansprechen auf die Chemo- und Bestrahlungstherapie (Altorki, Keresztes et al. 2003).

Aus diesem Grund sind die Nicht Steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) für Onkologen interessant, wobei von Vorteil wäre, COX-2 spezifische-Hemmer (z.B Celecoxib) im Sinne einer Chemotherapie einzusetzen, um die unerwünschten Nebenwirkungen nicht-selektiver COX-Hemmer (gastrointestinale Nebenwirkungen) zu vermeiden. Im September 2002 wurde der COX- 2 Hemmer Rofecoxib (VIOXX) weltweit vom Markt genommen. Grund für die Rücknahme der Medikamente waren Daten aus einer Langzeitstudie, bei der das Wiederauftreten von Darmpolypen bei Patienten untersucht wurde (APPROVe-Studie: Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx-Studie). Die Ergebnisse der APPROVe-Studie zeigten ein relatives Risiko von 1,96 für ein kardiovaskuläres Ereignis gegenüber dem Placebo (Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ 2001).

COX-3 ist eine Acetaminophen-sensitive Variante und induzierbare, Isoform von COX-1, die im Gehirn und Herzmuskel hoch exprimiert ist (Chandrasekharan, Dai et. al. 2002).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die selektive Inhibition der Cyclooxygenase-2 unter onkologischen Gesichtspunkten anscheinend die Zellproliferation reduziert, die Apoptose induziert und die Isoform 1 vermittelte Zellprotektion im Gastrointestinaltrakt und andere physiologische Aufgaben unberührt lässt (HigashiY, Kanekura T, Kanazaki T, 2000).

1.2.1.4 Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPA) - System

Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System) ist ein proteolytisches Enzymsystem, das bei Metastasierung und Wachstum diverser solider Tumore eine zentrale Rolle spielt.

Das uPA-System besteht aus dem Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ, den physiologischen Inhibitoren (PAI-1 und PAI-2) und dem uPA-Rezeptor (uPAR), welcher auf der Oberfläche von vielen Tumorzellen exprimiert wird.

Das uPA-System ermöglicht es Tumorzellen, die sie umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) abzubauen und so Metastasen zu bilden. Durch die Bindung der Urokinase an den Urokinase-Rezeptor wird auf der Oberfläche von Tumorzellen Plasminogen zu Plasmin aktiviert und nachfolgend der enzymatische Abbau der ECM ausgelöst und damit die Ausbreitung der Tumorzellen begünstigt.

Da die meisten Krebstode nicht durch das Wachstum des Primärtumors verursacht werden, sondern durch die Metastasierung des Tumors im Körper, wären Wirkstoffen indiziert, die gezielt Metastasierungsprozesse hemmen. Obwohl die genauen biochemischen Prozesse der Metastasierung, noch nicht voll untersucht sind, wurde aber schon nachgewiesen, dass das uPA-System eine entscheidende Rolle in der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen und des Primärtumorwachstums spielt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von uPA und PAI-1 im Tumorgewebe mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf und einer schlechten Prognose einhergeht (Look et. al.,2002).

1.2.2 Antiangiogene und antimetastasierende Therapieansätze

Die Hemmung der Tumorangiogenese und insbesondere der Tumormetastasierung ist eine vielversprechende Therapiestrategie in der Behandlung von malignen Tumoren. In Gegensatz zur konventionellen Behandlung ist bei der Angiogenesehemmung nicht eine direkte Zerstörung der malignen Zellen das Ziel, sondern die Unterbindung der Nährstoffversorgung und des Abtransportes von Stoffwechselmetaboliten und somit mit antimetastatischen Wirkungen verbunden.

Auf diesem Forschungsgebiet konnten in den letzten Jahren bereits vielversprechende präklinische und klinische Fortschritte erzielt werden. Die Angiogenese ist ein entscheidender Schritt bei der Progression und Metastasierung von Tumoren. Während konventionelle Therapiekonzepte, z.B. Chemotherapie und Bestrahlung, vor allem auf die Tumorzellen selbst abzielen, richtet sich ein antivaskulärer Therapieansatz auf die den tumorversorgenden Blutgefäßen.

Antivaskuläre Therapiestrategien können in Antiangiogenese und das sogenannte Vascular Targeting unterteilt werden.

1.3 Zielsetzung:

Die medikamentöse Therapie von HNO-Tumoren hat in den vergangenen 15 Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Bis zu den 90iger Jahren kam die zytostatische Chemotherapie lediglich bei inoperablen Rezidivtumoren oder Vorliegen von Fernmetastasen zum Einsatz. Im Gegensatz dazu ist die Chemotherapie heute nicht nur in der palliativen Situation, sondern auch -im Rahmen multimodaler Therapiekonzepten- vor allem bei Wunsch nach Organerhalt oder bei Vorliegen eines hohen Rezidivrisikos nach Resektion etabliert. Wesentliche Erkenntnisse der letzten Jahre umfassen die Optimierung der Induktionschemotherapie, welche nicht nur bei Wunsch auf Organerhalt sondern auch zunehmend bei lokal-inoperablen Tumoren eingesetzt wird, sowie die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Cetuximab in der Behandlung von Rezidiv- und lokal fortgeschrittenen Tumoren.

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung einer möglichst effizienten und nebenwirkungsarmen Therapie zur Inhibierung der Tumorzellinvasion und Tumorangiogenese und somit die Hemmung des Tumorwachstums und seiner Metastasierung.

Die Tumorbehandlung durch anti-angiogenetische Medikamente kann aufgrund der nebenwirkungsarmen Therapieform ein klinischer Erfolg sein. Eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase 2, Matrixmetalloproteasen, uPA und uPA-Rezeptoren (uPAR) in Tumorzellen korreliert mit zunehmender Malignität und schlechter Prognose.

Eine Kombination aus WX-UK1 ein uPA-System Inhibitor, Celecoxib ein selektiver COX-2-Inhibitor und Galardin ein Hemmer der Matrixmetalloproteasen wird verwendet, um das antitumorale Potential zu steigern. Mittels Durchflußzytometrie (FACScan) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde die Enzymexpression bestimmt.

Die grundlegende Hypothese war, dass diese dreifach Kombination die Tumorzellinvasion und somit die Metastasierung inhibiert.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurde die Hemmung der Tumorzellinvasion in zwei unabhängigen Modellen analysiert: im Sphäroid- sowie im Matrigelmodell.

Sphäroide sind in-vitro dreidimensionale Modelle die Analogien zur in-vivo Situation zeigen. Hierzu wurden Tumorzellen mit Fibroblastensphäroide mit und ohne Zugabe von Medikamenten kokultiviert. Die bildliche Darstellbarkeit der in die Sphäroide invadierten Tumorzellen wurde durch mikroskopische Methoden nach der Anfärbung der Tumorzellen überprüft und quantifiziert. Desweiteren wurde das Matrigelmodell verwendet, in dem Tumorzellen durch eine Kollagenmatrix invadieren müssen. Diese Kollagenmatrix entspricht der Bindegewebs-Situation im menschlichen Körper. Die

Medikamente wurden in Kombination angewendet. Im Lichtmikroskop konnten die, durch die Kollagenmatrix invadierten Zellen, ausgezählt und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle quantifiziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 MATERIAL

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Epitop	Isotyp	Verdünnung	Firma
Anti-proMMP1 (monoclonal)	Pro-MMP1	IgG 1(mouse anti-human)	1:100	R&D Systems
Anti-MMP1 (monoclonal)	MMP1	IgG 1(mouse anti human)	1:100	R&D Systems
Anti-MMP2 (monoclonal)	MMP2	IgG 1(mouse anti-human)	1:100	R&D Systems
Anti-MMP3 (monoclonal)	MMP3	IgG (goat anti-mouse)	1:100	R&D Systems
Anti-MMP9 (monoclonal)	MMP9	IgG1(mouse anti-human)	1:100	R&D Systems
IgG FITC- conjugated	Sekundär antikörper	IgG (Goat Anti Mouse)	1:50	Jackson- immuno Research
IgG FITC- conjugated (polyclonal)	Sekundär antikörper	IgG (Rabbit Anti Goat)	1:50	Dako Cytomation

Tabelle 1.1 verwendete Antikörper

2.1.2 Chemikalien, Geräte und Sonstiges

Chemikalien und Sonstiges

Artikel	Bezugsquelle
Aceton	Merk, Darmstadt
Agarose	
Antibiotika (Penicillin, Streptomycin)	Seromed / Biochrom, Berlin
Celecoxib	50 mM, Molekula, Nienburg / Weser
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	Seromed / Biochrom, Berlin
Einschlußmedium für Objektträger	Eukitt, Freiburg
Enzymimmunoassays (ELISAs)	Quantikine® Human VEGF Immunoassay R&D System, Mineapolis, USA;
Fötales Kälberserum (FCS)	Seromed / Biochrom, Berlin
Galardin	5 mg, Calbiochem, Germany
Glyceringelatine, Kaisers	G Merk, Darmstadt
Human Recombinant Flt/Flk-2 Ligand	5 µg, Calbiochem, Germany
Human Recombinant Thrombopoietin	5 µg, Calbiochem, Germany
Human Stem Cell Factor	10 µg, Biochrom AG
Methanol	Merck, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS) - Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Taq-Polimerase, Reagenzien für Polymerase Kettenreaktion (PCR)	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Thiazolylblau-Tetrazolium Bromid	Sigma, Taufkirchen
Tissue-Tek OCT Compound	Sakura Finotek, Niederlande
Trypsin/EDTA	Seromed/Biochrom, Berlin
Tryptanblau	Seromed/Biochrom, Berlin
VEGF 165, human	R&D System, Mineapolis, USA
Willex UK 1 (D- und L- Form)	1µg / ml, Willex AG, München

Tabelle 1.2 verwendete Chemikalien

Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle
Einmalpipetten	Costar, New York(USA); Falcon/BD, Heidelberg
Objektträger„Superfrost“	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Bad Camberg
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falcon/BD Le Pont de Claix(F); Nunc, Wiesbaden
Skalpelle	Feather/PFM, Köln
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Zellkammer	Fast-Read, Firma Biosigma, Cona, Italien
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturflaschen und –schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengefäße 1,5ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
Pore-Einsätze für Chemotaxis Assay, 8µm	Falcon Biosciences, Boston, USA
Matrigel Invasion Chamber, 8µm	Schubert&Weiss, München

Tabelle 1.3 verwendete Materialien

Geräte

Artikel	Bezugsquelle
Durchflusszytometer „FACSCalibur“	Becton-Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader EIX 800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, München
Kryotom	Leika, Solms
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Pipetus	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
PCR-Gerät (Thermocycler)	Biometra, Göttingen
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Tiefkühltruhe	Hereus, München
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Hettich, Tuttlingen; Hereus, München
Steriler Werkbank	Haereus, München

Tabelle 1.4 verwendete Geräte

Zellen

Zelllinie	Ursprung	Referenz
FaDu	Hypopharynx-Karzinom	ATCC
HeLa	Zervix-Karzinom	ATCC
Fibroblasten	aus der Hautbiopsien von freiwilligen Spendern	primäre Zellen

Tabelle 1.5 verwendete Zellen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen

2.2.1.1 Etablierte Zelllinien

Als Grundlage für die vorliegende Arbeit dienten verschiedene humane Zelllinien: HeLa Zellen (Zervixkarzinomzellen), FaDu Zellen (Plattenepithelkarzinom der Hypopharynx), NIH Zellen (Mausfibroblasten), humane primäre Fibroblasten (aus der Hautbiopsien von freiwilligen Spendern). Die HeLa-, FaDu- und die Fibroblasten Zellen wurden in standard DMEM (Dulbecco`s MEM) Medium mit 10% FCS und 1% Antibiotika (Penicillin-Streptomycin) kultiviert.

2.2.1.2 Zellkultur

Um Kontaminationen zu verhindern, mussten die Zellkultur-Arbeiten unter einer sterilen Werkbank durchgeführt werden. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Um eine Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden die Zellen zweimal wöchentlich passagiert.

Adhärend wachsende Zelllinien wurden mit PBS serumfrei gewaschen, da das im Medium enthaltene Serum die Wirkung des Trypsins beeinträchtigt. Durch Behandlung mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA wurden die Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die durch Trypsinierung abgelöste Zellschicht wurde im serumhaltigen Kulturmedium aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde 5 min bei 22°C und 270 rcf zentrifugiert und in neuem Medium auf neue Zellkulturschale ausplattiert.

Die Zellen (1×10^7 Zellen) konnten in einem Medium aus 10% DMSO, 40% FCS und 50% DMEM Medium bei –80°C oder bei –180°C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet. Tote Zellen nahmen Trypanblau sofort auf, das Zytoplasma färbte sich blau, was lichtmikroskopisch zu erkennen war. Die Zellmembran lebender Zellen war erst nach 5-10 min permeabel, der Farbstoff drang entsprechend später ein.

Ein Aliquot der Zellsuspension (20µl) wurde im definierten Verhältnis mit dem Farbstoff gemischt und in einer Neubauer Kammer überführt und ausgezählt.

Folgende Formel ergab die Zellzahl pro ml Zellsuspension:

$$\text{Anzahl der Zellen/ml} = \text{Zellen/Feld} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{Gesamtzahl der Zellen in Suspension} = \text{Zellen/ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

2 Verdünnungsfaktor

10^4 Kammerfaktoren

2.2.2 Durchflußzytometrie (FACS-Analysen)

2.2.2.1 Prinzip:

Bei der FACS-Analyse werden Antigene auf der Oberfläche oder innerhalb der Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen. Die Zellen bei der FACS-Analyse sind nicht adhärent, sondern sie liegen in einer Zellsuspension vor. Sie werden vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Argon-Laserlicht führt zu einer Exzitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Mit Hilfe des FACS-Gerätes können in ca. 10 Sekunden 10.000 Zellen untersucht werden. Gleichzeitig können mit diesem Gerät auch Zellen sortiert werden.

Die Auswertung der erfassten Daten erfolgt per Computer

2.2.2.2 Antikörper

Will man ein bestimmtes Merkmal einer Zelle im FACS-Gerät untersuchen, muss man dieses Merkmal zuerst einmal markieren. Das geschah mit einem Antikörper, der gegen dieses Merkmal gerichtet war. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper waren Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün) konjugiert.

Bringt man Antikörper und Zellen zusammen, setzt sich der Antikörper auf diejenigen Zellen, die das Merkmal auf der Oberfläche tragen. Die Zelle war dadurch markiert und hatte bei Durchqueren des Laserstrahls des Durchflußzytometers aufgeleuchtet.

Die verwendeten primär Antikörper für die Versuchsreihen dieser Arbeit waren Anti-proMMP1, Anti-MMP1, Anti- MMP2, Anti- MMP3, Anti- MMP9 und die Kontrollantikörper.

2.2.2.3 Methode extrazelluläres FACS:

5×10^6 HeLa Zellen wurden pelletiert und in einer 1:100 Verdünnung des jeweiligen Antikörpers in FACS-Puffer für eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert und dann dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in einer 1: 50 Verdünnung mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (FITC gekoppelt) für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Oberflächenexpression im Durchflußzytometer bestimmt.

Als Positivität wurde eine Verschiebung der Kurve nach rechts im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

FACS- Puffer: PBS + 2% FKS

2.2.3 MTT- Assay (Bestimmung der Zellviabilität)

2.2.3.1 Prinzip:

Mit dem MTT- Gerät ELX 800, Firma Bio-Tek Instruments konnte man die Viabilität der Zellen durch die Aktivitätsanalyse der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmen.

Es wird auch für die quantitative Bestimmung des antiproliferativen oder cytotoxischen Effekts verwendet. Dadurch lässt sich die Toxizität bestimmter Wirkstoffe auf die Zellen bestimmen und die maximal tolerierte Dosis erkennen.

Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu einem unlöslichen, lilafarbenen Formazan, die nur in lebenden Zellen abläuft.

Die Formazan Kristalle MTT sind in der wässrigen Lösung unlöslich, aber können solubilisiert werden, indem man die Solubilisierungslösung addiert. Das solubilisierte Formazan Produkt wurde mit einem ELISA-Leser photometrisch (Wellenlänge zwischen 540-630 Nanometer) quantitativ bestimmt. Eine Zunahme der Zahl lebender Zellen ergibt eine Zunahme der metabolischen Tätigkeit, die zu einer stärkeren Färbung führt.

2.2.3.2 Methode

- je 3×10^3 Zellen in 200µl Medium/Loch wurden auf 96 Multiwellplatten ausgesät
- nach Adhärenz (24 h) wurden jeweils 20 µl Celecoxib, Galardin und WX-UK1 (D und L Form) am ersten und am dritten Tag der Messung zu den Zellen pipettiert.

Nach der Herstellung der MTT Lösung (1 Flasche MTT Pulver in 20 ml PBS) wurden jeweils 10 µl davon in jedem Well dazugegeben und die Platte vier Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach der angegebenen Zeit wurden die Zellen mit 200µl Lysepuffer (24ml Isopropanol und 1ml HCl 1N) von dem Wellboden lysiert und mittels Elysa Reader analysiert.

2.2.4 Tumorzell-Sphäroide

2.2.4.1 Prinzip

Multizelluläre Sphäroide sind dreidimensionale in-vitro Zellstrukturen, die im Gegensatz zur Monolayerkultur histomorphologisch, physiologisch und funktionale Analogien zu in-vivo Situation zeigen. Sphäroide lassen sich sowohl von gesunden, als auch von Tumorzellen generieren und ermöglichen den Einblick in eine Reihe biologischer Vorgänge.

2.2.4.2 Methode

Es wurden mit 50µl 1% Agarose Lösung (1g Agarosepulver in 100ml sterilem PBS) beschichtete 96 Well-Platten benutzt. Primäre Fibroblasten ($1-1,5 \times 10^4$ Zellen) wurden in 100µl Medium (DMEM Medium mit 10% FCS) pro Well ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden Fibroblastensphäroiden mit HeLa- (8×10^3 Zellen) bzw. FaDu-Einzelzellen (3×10^3) zusammenkultiviert. 20 µl Celecoxib (5µMol), 20µl Galardin (10µMol), 20µl WX-UK1 D und L (1 µg/ml) als alleinige Medikation, als zweifach (20µl Celecoxib und 20µl Galardin, 20 µl Celecoxib und 20µl WX-UK1L, 20 µl Galardin und 20µl WX-UK1L) und als dreifach Kombination (20µl Celecoxib mit 20µl Galardin und 20µl WX-UK1D (1µg/ml) bzw. 20µl Celecoxib mit 20µl Galardin 20µl WX-UK1 L(1µg/ml)) wurden hinzugefügt. Nach 48 Stunden Kokultivierung, wurde die erste Sphäroid - Platte geerntet. Das Medium von der zweiten Platte wurde gewechselt und erneut Medikamenten hinzugegeben. Am nächsten Tag wurde auch die zweite Sphäroidenplatte geerntet und eingefroren.

2.2.4.3 Einbettung und Verarbeitung von Sphäroiden

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Sphäroide von der Agarose genommen und in ein Einbettungsschälchen überführt. Das Kulturmedium wurde komplett entfernt, die Sphäroide mit FACS freiem Medium gewaschen und mit 1 µl Eosin angefärbt. Hierauf erfolgte die luftblasenfreie Überschichtung mit Einbettmedium und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Blöcke wurden mit einem Kryostat zu 5 µm dünne Präparaten bei -19°C geschnitten. Die Schnitte wurden auf 3-Aminopropyl-Trioxysilan beschichtete Glasobjektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Schnitte wurden am nächsten Tag für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert und erneut luftgetrocknet.

Anschließend wurden sie, zur Vermeidung von Gefrierbrand, in Alufolie eingewickelt und bei -20°C gelagert.

2.2.4.4 Hämatoxylin – Eosin – Färbung

Die luftgetrockneten und Aceton-fixierten Schnitte wurden fünf Minuten in 4% Paraformaldehyd vorbehandelt, zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen, dann zehn Minuten mit Hämalaun gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Zytoplasmafärbung mit Eosin (fünf Minuten). Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe differenziert (70%ig bzw. 80%ig Ethanol), fixiert (fünf Minuten 96% Ethanol, fünf Minuten 100% Ethanol), zehn Minuten in Xylol ausgehärtet und mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg) eingedeckt.

2.2.4.5 Immunhistochemische Färbungen

Zur immunhistochemischen Aufarbeitung der Sphäroidschnitte wurde die Avidin- Biotin- Peroxidase- Complex- Methode (ABC) verwendet.

ABC-Färbung: Bei dieser Methode wird ein biotinylierter, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper eingesetzt, der mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (ABC = Avidin-Biotin-Komplex) eine feste Bindung eingeht. Durch die Reaktion der Peroxidase mit Aminoethylcarbazol (AEC) bzw. mit Diaminobenzidin (DAB) in der Färbelösung entsteht die rotbraune spezifische Farbreaktion.

Nach Auftauen, Fixieren und Lufttrocknen (s.o) wurden die Präparate fünf Minuten in PBS gestellt, dann zur Blockierung endogener Peroxidasen in derselben Küvette 30 Minuten unter Zusatz von 200µl Wasserstoffperoxid geschwenkt und hierauf wieder zehn Minuten in PBS belassen. Auch hier erfolgten die weiteren Schritte wieder in einer feuchten Kammer. Für die folgenden 25 Minuten wurden die Objektträger in PBS mit normalem Pferdeserum (1:20) inkubiert (Absättigung unspezifischer Bindungen) und anschließend eine Stunde mit Primärantikörper versehen. Nach dreimaligem Waschen durch Schwenken in PBS wurde der biotinylierte Zweitantikörper (1:200) unter Zugabe von 30% humanem AB- Serum 30 Minuten auf die Präparate gegeben, die dann (nach weiteren drei Waschschriften) für eine halbe Stunde mit dem Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex inkubiert, nochmals gewaschen und dann in die AEC- bzw. DAB- Lösung (entsprechend den Anleitungen des Herstellers) gegeben. Zur Beendigung der Färbung

wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun.

Die in die Fibroblastensphäroide eingedrungenen Tumorzellen wurden nach immunhistochemischer Färbung mit KL1 (Panzytocheratin) lichtmikroskopisch quantifiziert. Epithelzellen oder Zellen epithelialer Herkunft, wie Karzinomzellen enthalten in ihrem Zytoskelett Zytokeratine.

Der Antikörper KL1 bindet an ein Epitop, das in den verschiedenen Organen gleichermaßen geeignet ist. Somit wird gewährleistet dass er für den Nachweis von Karzinomzellen aus verschiedenen Organen gleichermaßen geeignet ist.

Nach Immunperoxidasefärbung von Zytokeratinen stellte sich das Zytoplasma von Tumorzellen rotbraun dar.

2.2.4.6 Mikrofotografische Dokumentation

Sie erfolgte mittels einer auf das Lichtmikroskop der Firma Zeiss aufgeschraubte Digitalkamera und Bilddatenspeicherung im Computer. Für das Lichtmikroskop wurde ein Plan 200 x Objektiv gewählt.

Von jedem Objektträger wurde mindestens einen Sphäroid-Schnitt aufgenommen.

2.2.5 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Der Name PCR ist eine Abkürzung für Polymerase – Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction).

2.2.5.1 Prinzip

Die PCR ist eine Labormethode zum Nachweis von bestimmten DNA - Abschnitten mit bekannter Sequenz im Erbmaterial. Die DNA liegt normalerweise doppelsträngig vor und wird zu Beginn des Prozesses durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt. Am Anfang und am Ende des spezifischen Abschnitts werden Starthilfen, sog. Primer gesetzt, die das gegengleiche Muster der DNA besitzen und sich auf Grund dessen an die vorbestimmten Stellen binden können. Zu dem dazwischen liegenden DNA Abschnitt wird mit Hilfe des Enzyms Polymerase der jeweils gegengleiche (komplementäre) DNA Strang aufgebaut (synthetisiert). Der derart gebildete Doppelstrang wird durch Erhöhung der Temperatur wieder getrennt. Damit sind die Bindungsstellen für die Primer erneut frei und der Vorgang kann nach dem Absinken der Temperatur von neuem starten. Nun liegt die doppelte Anzahl der DNA Abschnitte vor, da dieser bereits einmal neu aufgebaut

(synthetisiert) wurde. Durch häufiges Wiederholen dieses Vorganges wird eine exponentielle Vervielfältigung (Amplifizierung) dieses DNA Abschnittes erreicht. Die entstandenen DNA Abschnitte (Amplifikate) können durch verschiedene weitere Methoden sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

Die Amplifikate werden in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die zu erwartende Größe der Amplifikate wird mit Hilfe eines DNA-Längenstandards abgeschätzt.

2.2.5.2 Methode

Der PCR-Prozess bestand aus einer Serie von 20 bis 30 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten.

Zunächst wurde die doppelsträngige DNA auf 96°C erhitzt um die Stränge zu trennen. Dieser Schritt wird Melting (Schmelzen) genannt. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, wurden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wurde die DNA oft für längere Zeit erhitzt um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.

Nach der Trennung der Stränge wurde die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt heißt Annealing (Anlagern). Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 25°C unter ihrem Schmelzpunkt. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht oder an der falschen Stelle an der Ausgangs-DNA anlagern.

Schließlich füllte die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Sie begann am angelagerten Primer und folgte dann dem DNA-Strang. Dieser Schritt heißt Elongation (Verlängerung). Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der DNA-Polymerase ab, die Zeit, die dieser Schritt benötigt, von der DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll. Sie liegt zwischen 68 und 72°C.

- Schmelzen bei 96°C.
- Anlagerung bei 68°C.
- Verlängerung bei 72°C (P=Polymerase).
- Der erste Zyklus ist beendet.

Das Reaktionsgemisch bestand aus:

- 1,0 µl DNA-Vorlage

- 2,0 µl MgCl₂
- 0,2 µl Primer, 0,1 µl pro Primer
- 0,3 µl Polymerase (TAQ)
- 2,0 µl Nukleotide (dNTP 2mM)
- 2,0 µl Pufferlösung
- 12,5 µl H₂O

Ein 200 µl Reaktionsgefäß mit den 20 µl Gemisch wurde in den Thermocycler gestellt.

2.2.6 Migrations- und Invasionsversuche

2.2.6.1 Migration

Für den Versuch wurden 8 µm Migrationskammer benötigt.

Die Zellen wurden über Nacht in DMEM ohne FCS kultiviert. Jeweils 10⁵ Zellen wurden dann mit 500 µl DMEM Medium ohne FCS unter Zugabe von Medikamenten in einer Migrationskammer gegeben, in die untere Kammer (12-Loch Platte) 1,5 ml DMEM Medium mit 10% FCS, und für 24 Std. bei 37°C inkubiert.

Der Überstand wurde dann abgenommen und die Zellen auf der Oberfläche der Membran mit Hilfe befeuchteter Wattestäbchen entfernt. Die durch der Membran durchmigrierten Zellen wurden mit 100%igem Methanol fixiert (2 min, 750µl), mit Toluidinblaulösung gefärbt (4min, 500µl) und mit Aqua dest. dreimal nachgewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem scharfen Skalpell von dem Einsatz getrennt, auf einem Objektträger gebracht und mit Gellée benetztem Deckgläschen abgeschlossen. Die Membranen konnten dann im Lichtmikroskop angeschaut werden und die migrierten Zellen ausgezählt werden.

2.2.6.2 Invasion

Die Zellen wurden in der Konzentration von 5x10⁴/1ml Medium für 36h ausgesät und wuchsen in Standardmedium ohne FCS und unter Zugabe von Celecoxib (5µM), Galardin (10µM) und D- und L- Enantiomere der WX-UK1 (1µg/ml).

Die Matrigel-Einsätze wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, in eine 24-Loch Platte gestellt und mit DMEM 2 Std. bei 37°C in einem wasserdampfgesättigten Inkubator rehydriert. Jeweils 2,5 x 10⁴ von den behandelten Zellen werden mit 500µl DMEM ohne FCS auf einen Matrigel Einsatz und unter erneuter Zugabe von Medikamente (Celecoxib

5 μ M, Galardin 10 μ M, WX-uK1 1 μ g/ml) gesät, in die untere Kammer (24-Loch Platte) wurde 500 μ l DMEM mit 10% FCS eingefüllt und bei 37°C in einem wasserdampfgesättigter Inkubator gelagert. Nach 36 Stunden wurden die nicht invadierten Zellen mittels eines Wattestäbchen vorsichtig vom oberen Teil der Membran entfernt und die am unteren Teil der Membran sitzenden invadierten Zellen wurden nach der Fixierung mit 100% Methanol (500 μ l, 2min) mit Toluidinblaulösung (500 μ l, 2min) gefärbt.

Danach wurden sie dreimal in Aqua dest. nachgewaschen und mit einer schnellen Alkoholreihe entwässert. Mit einem Skalpell wurde das Matrigel von dem Einsatz getrennt, auf einen Objektträger gebracht (Eukitt) und mit einem Deckgläschen abgeschlossen. Im Lichtmikroskop konnten die invadierten Zellen ausgezählt werden.

Toluidinblaulösung: 35% Ethanol, 5 μ g / ml Toluidinblau in Aqua dest. über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren, dann in Verhältnis 1:1 mit 70%igem Ethanol aufgefüllt.

Schnelle Alkoholreihe: 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol, Xylol.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP) in HeLa- und FaDu - Zellen

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression von MMPs an HeLa- und FaDu - Zellen mittels Durchflußzytometrie überprüft.

Die HeLa Zellen wurden mit monoklonalen Antikörper gegen proMMP, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 und sekundär mit FITC markierten Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Positivität wurde eine Verschiebung der Kurve nach rechts im Vergleich zur Kontrolle betrachtet.

Die FACSs-Analyse ergab eine eindeutige Lokalisation von MMP1 an der Zelloberfläche von HeLa Zellen und eine fehlende Expression von proMMP1, MMP 2, 3, 9.

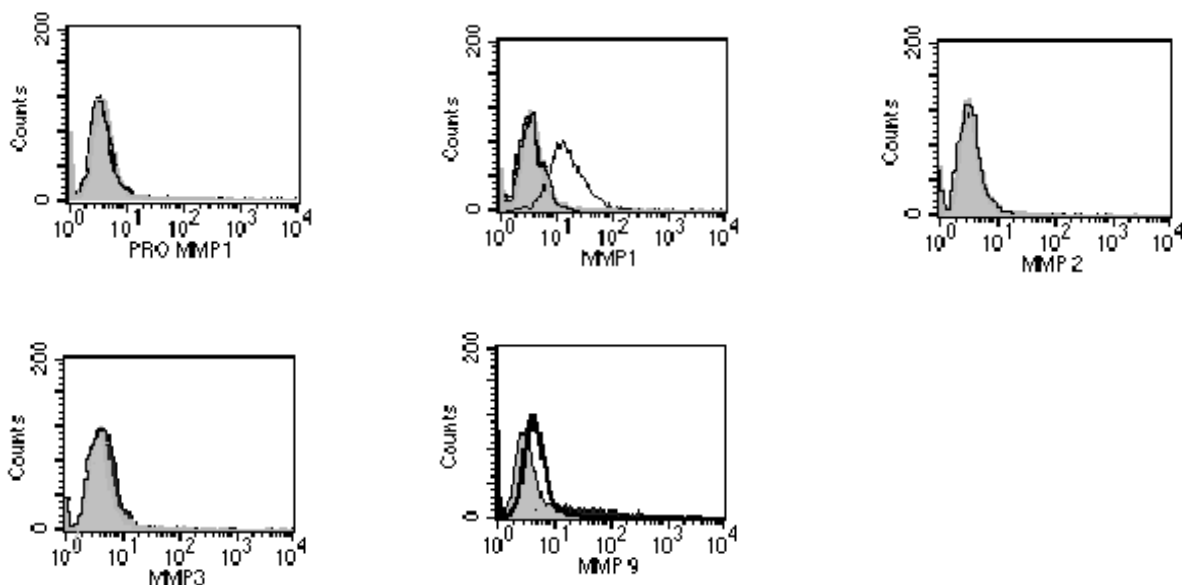


Abbildung 1.1 : Analyse der Matrix-Metalloproteinase Oberflächenexpression auf HeLa Zellen in der Durchflusszytometrie (graue Kurve: unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers = Kontrolle, schwarze Kurve: tatsächliche MMPs-Expression). Die Messung erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen proMMP1-, MMP1-, MMP2-, MMP3-, MMP9 und mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Versuchen.

Die FACS - Analyse der Matrix - Metalloproteinase Oberflächenexpression zeigte, dass die FaDu- Zelllinie MMP-3 und MMP-1 exprimieren, jedoch nicht MMP- 2 und MMP- 9.

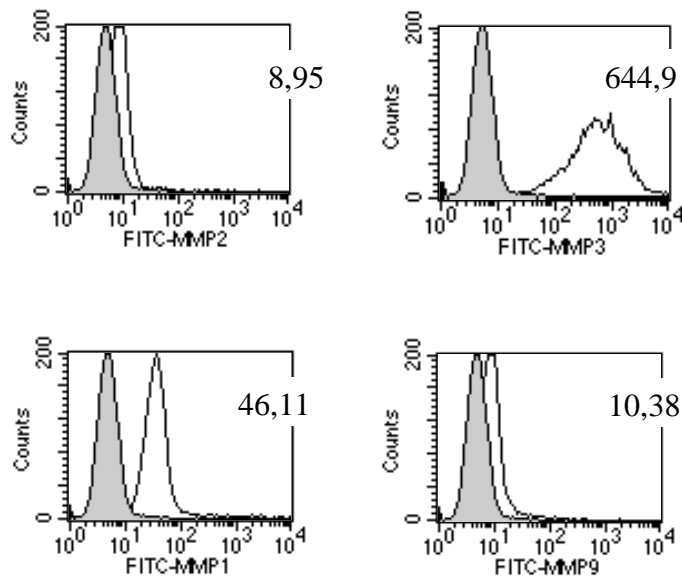
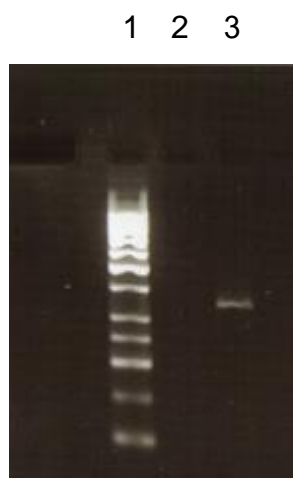


Abbildung 1.2 : Analyse der Matrix-Metalloproteinase Oberflächenexpression auf FaDu Zellen in der Durchflusszytometrie (grau-gefüllte Kurve: unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers, schwarze Kurve: tatsächliche MMPs-Expression). Die Messung erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen MMP1-, MMP2-, MMP3-, MMP9 und mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen.

3.2 COX 2 Expression in Cervixkarzinom- (HeLa) und Hypopharynxkarzinom-Zelle (FaDu)

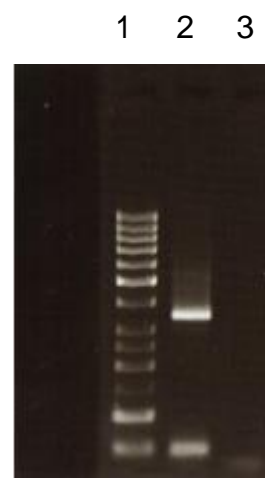
Zur Überprüfung des Expressionsprofil von Cyclooxygenase 2 (COX-2) bei den HeLa- und FaDu-Zellen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurde zuerst RNA aus den Tumorzellen isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Ausgewertet wurde das Ergebnis mit Hilfe einer Gelelektrophorese.

Alle beiden untersuchten Zelllinien (FaDu- und HeLa Zellen) exprimierten COX-2. Die Höhe der Banden lag im Bereich des Molekulargewichtsmarkers von 350bp und entsprach damit die Sequenzgrösse der COX-2.



FaDu Zellen

1= 50bp Marker; 2= Negativkontrolle
3= Probe



HeLa Zellen

1= 50bp Marker; 2= Probe;
3= Negativkontrolle

Abbildung 2.1: Nachweis von COX-2 Expression in FaDu- und HeLa-Zellen mittels rt - PCR

3.3 Einfluss von Celecoxib, Galardin, WX-UK1 (D und L Form) auf die Vitalität der HeLa, FaDu und Fibroblasten-Zellen (MTT-Assay)

Es wurden drei Zelltypen untersucht: HeLa- und FaDu- Zellen (Zelllinien) und Fibroblasten Zellen (primäre, humane Zellen). Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse nach 4 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h unter Behandlung mit Celecoxib (5 μ M), Galardin (10 μ M) und den beiden Enantiomere D- und L WX-UK1 (1 μ g/ml) als alleinige, zweifach- und dreifach Kombination. Der MTT - Test erfolgte in dreifacher Bestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen von den drei Versuchen.

Gleich nach der Ausplattierung der Zellen, wurden diese mit den Medikamenten in den angegebenen Konzentrationen exponiert und über 5 Messtage verfolgt. Die Angaben sind bezogen auf die Extinktion vom ersten Tag.

Die Befunde an der Cervixcarzinomzelllinie (HeLaZellen) sowie Hypopharynxcarzinomzelllinie (FaDu Zellen) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- unter der Zugabe von Medikamenten konnte nur ein leichter Wachstumsunterschied der Zellen beobachtet werden. In der HeLa Zell Kontrolle, war ein Anstieg der Zellzahl zu beobachten, der am 5. Tag der Inkubation einen sechsfachen Wert des Ausgangswertes erreichte. Die mit der dreier Kombination (Celecoxib (5 μ M/ml), Galardin (10 μ M/ml), WX-UK1 D und L Form (1 μ g/ml)) behandelten Zellen zeigten nach 96 Stunden einen kontinuierlichen Anstieg der Zell Zahl von ca. dem zehnfachen des Ausgangswertes. In allen anderen Kombinationen, kam es bis zum 5. Tag zu einem Anstieg der Zell Zahl, es zeigte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle.

In der FaDu Zellen war in der Kontrolle ein Anstieg der Zell Zahl zu beobachten, der am 5. Tag der Inkubation einen Wert des 2,1 fachen des Ausgangswertes erreichte. Die mit der dreier Kombination (Celecoxib (5 μ M/ml), Galardin (10 μ M/ml), WX-UK1 D und L Form (1 μ g/ml)) behandelten Zellen zeigten nach 96 Stunden einen kontinuierlichen Anstieg der Zell Zahl von ca. dem 2,5 fachen des Ausgangswertes. In allen anderen Kombinationen, kam es ebenso bis zum 5. Tag zu einem Anstieg der Zell Zahl.

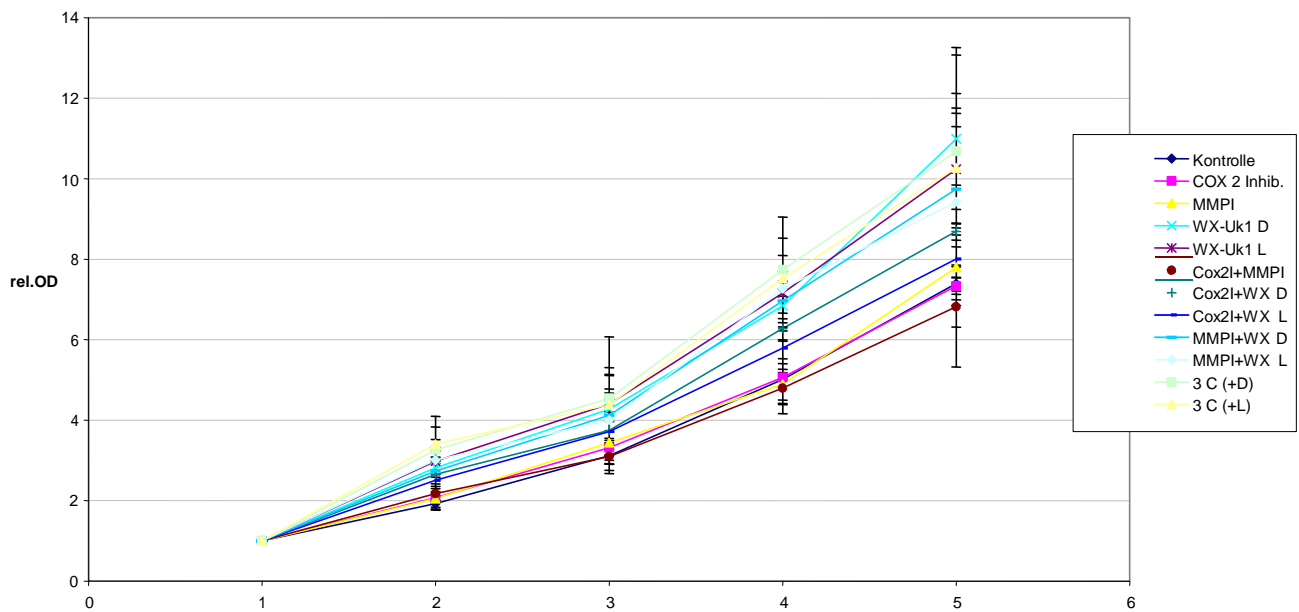


Abbildung 3.1 : Wachstumsverhalten der Zelllinie HeLa unter Zugabe von Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$), WX-UK1 D und L Form ($1\mu\text{g/ml}$) als alleinige Therapie, zweifach und dreifach Kombination. HeLa Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^3 Zellen/ $200\mu\text{l}$ mit unterschiedlichen Medikamenten bei 37°C über 5 Tagen inkubiert. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

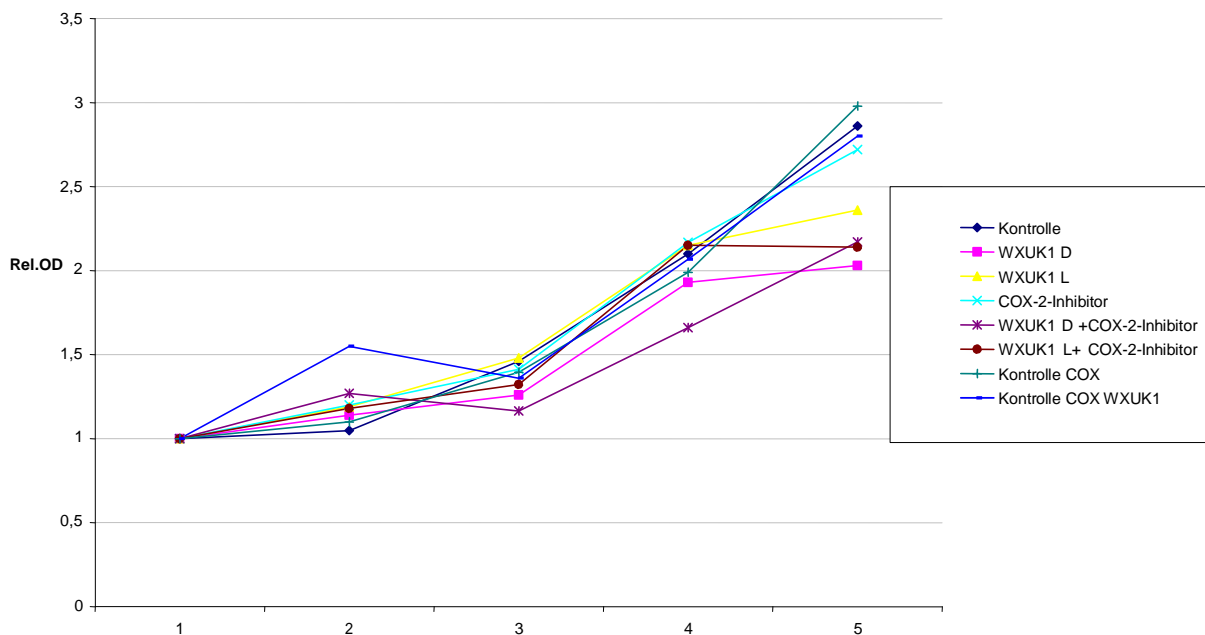


Abbildung 3.2 : Wachstumsverhalten der Zelllinie FaDu unter Zugabe von Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$), WX-UK1 D und L Form ($1\mu\text{g/ml}$) als alleinige Therapie, zweifach Kombination. FaDu Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^3 Zellen/ $200\mu\text{l}$ mit unterschiedlichen Medikamenten bei 37°C über 5 Tagen inkubiert. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

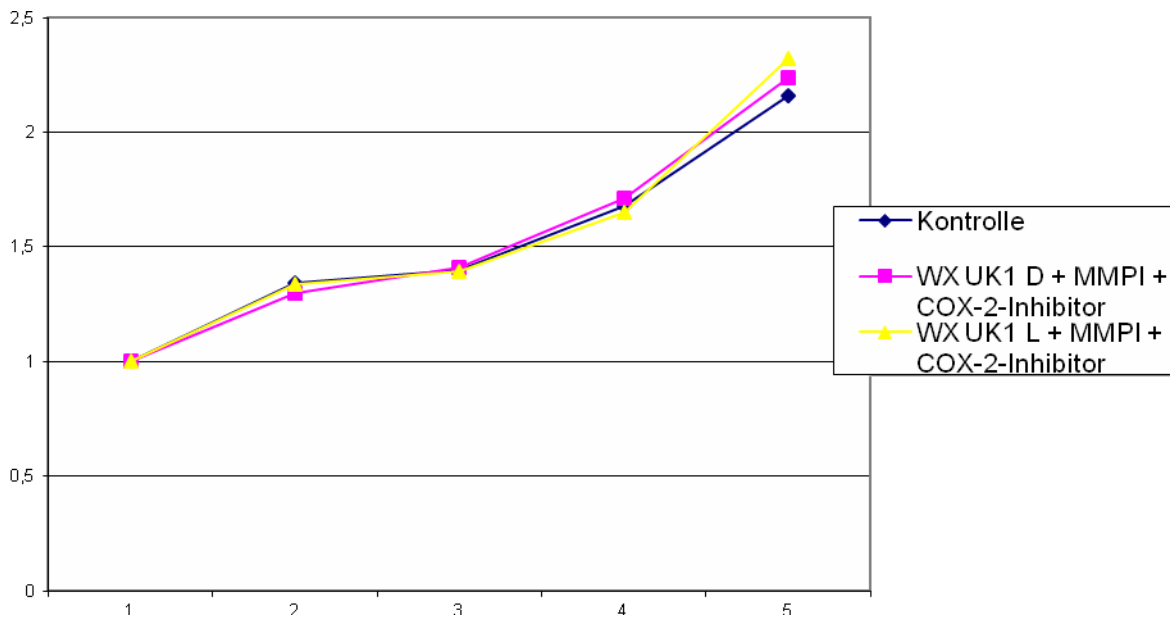


Abbildung 3.3 : Wachstumsverhalten der Zelllinie FaDu unter Zugabe von Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$), WX-UK1 D und L Form ($1\mu\text{g/ml}$) als dreifach Kombination. FaDu Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^3 Zellen/ $200\mu\text{l}$ mit unterschiedlichen Medikamenten bei 37°C über 5 Tagen inkubiert. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Fibroblasten MTT Assay :

In der Kontrolle zeigte sich ein stetiges Zellwachstum bis zum 5. Tag, an dem die Zellzahl das 4,5- fache des Ausgangswertes betrug. Bei den behandelten Zellen war am 3. Tag eine leichte Abnahme der Zellzahl festzustellen. Nach weiterer Inkubation mit den Medikamenten war bis zum 5. Tag ein kontinuierliches Zellwachstum bis auf das 5 - 6 fache des Ausgangswertes zu beobachten. Unter Inkubation mit den Medikamenten zeigte sich das Zellwachstum gegenüber der Kontrolle verstärkt.

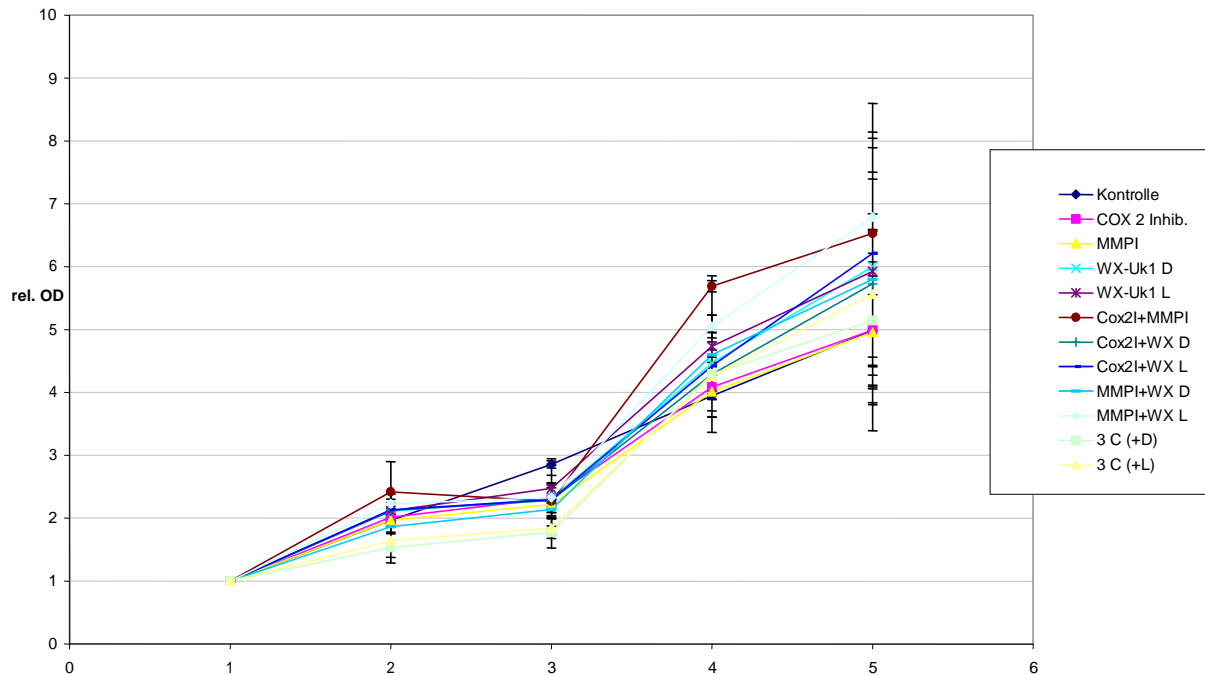


Abbildung 3. 3 : Wachstumsverhalten von Fibroblasten Zellen unter Zugabe von Celecoxib ($5\mu\text{M}/\text{ml}$), Galardin ($10\mu\text{M}/\text{ml}$), WX-UK1 D und L Form ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) als alleinige Therapie, zweifach und dreifach Kombination. Die Fibroblastenzellen wurden in einer Konzentration von 3×10^3 Zellen/ $200 \mu\text{l}$ mit unterschiedlichen Medikamenten in angegebener Konzentration bei 37°C über 5 Tagen inkubiert. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimente.

Fazit: Die Proliferation aller untersuchten Zellen wurde durch die Zugabe von Medikamenten nicht beeinflusst, so dass ein zytotoxischer Effekt der Medikamente in angegebener Dosis ausgeschlossen werden kann.

3.4 Migration

Im Folgenden wird anhand von Balkendiagrammen die Migration von Cervixcarzinomzellen (HeLa Zellen) und Hypopharynxcarzinomzellen (FaDu Zellen) analysiert. Dargestellt sind jeweils prozentuale Werte, wobei als 100% die Migration von Tumorzellen durch die 8 μm Poren der Migrationskammern nach 24 h Inkubation in FCS freies-Medium ohne Zugabe von Medikamenten (Kontrolle) angezeigt wird.

Es konnte gezeigt werden dass die untersuchten Zellen transmigrierend waren, eine Behandlung mit der o.g Kombination mit WX- UK1 Enantiomer L eine minimale Hemmung der Migration der FaDu Zellen von < 10% bewirkte. Bei HeLa Zellen zeigte sich unter der Behandlung kein Einfluss auf das Migrationspotential.

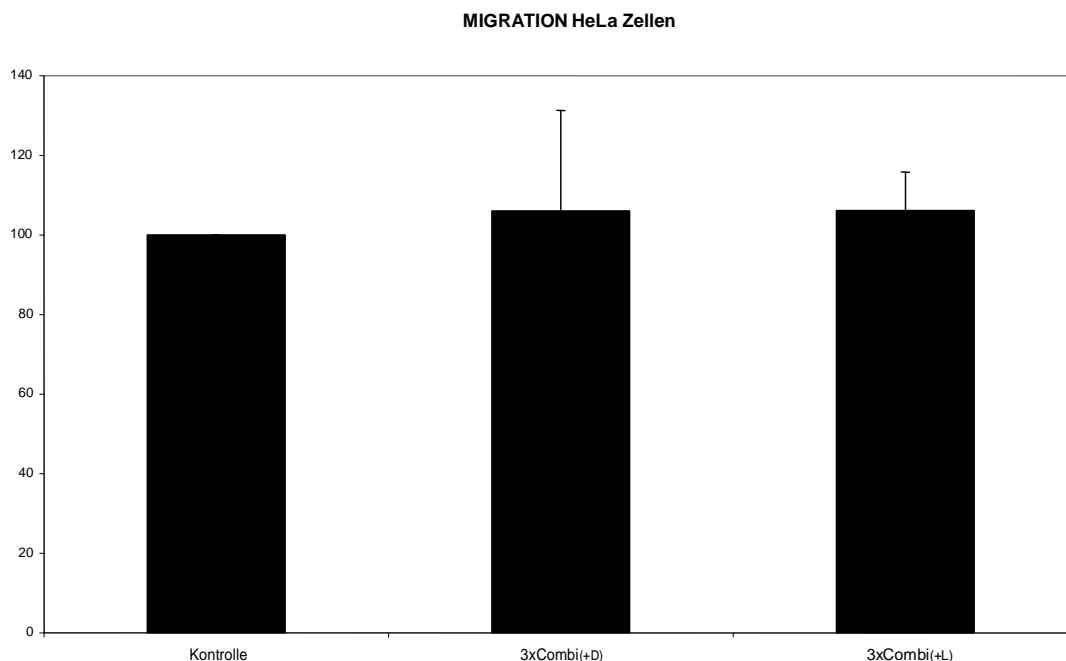


Abbildung 4.1: Migration der HeLa Zellen durch die 8 μm Poren der Migrationskammern nach 24 h Inkubation in FCS freies-Medium (Kontrolle) und nach Zugabe von Medikamenten (3xCombi(+D)- Celecoxib, Galardin, WX-UK1 D Form; 3xCombi(+L)- Celecoxib, Galardin, WX-UK1 L Form). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

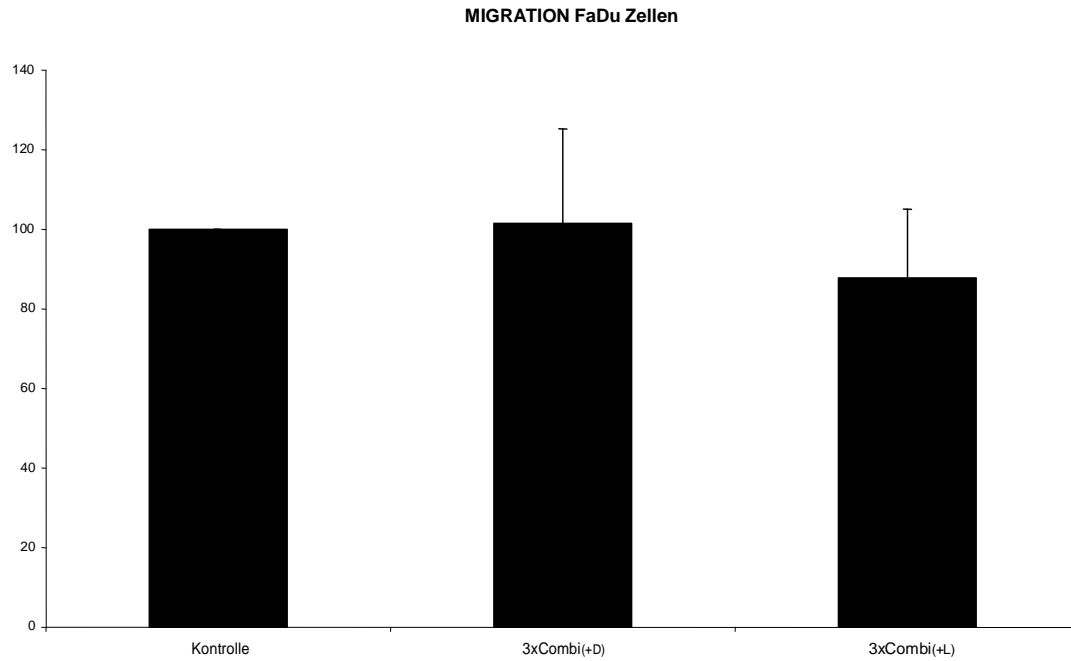


Abbildung 4.2: Migration der FaDu Zellen durch den 8µm Poren von Migrationskammern nach 24 h Inkubation in FKS freies-Medium (Kontrolle) und nach Zugabe von Medikamenten (3xCombi(+D)- Celecoxib, Galardin, WX-UK1 D Form; 3xCombi(+L)-Celecoxib, Galardin, WX-UK1 L Form). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

3.5 Invasion

3.5.1 Invasion von HeLa und FaDu Zellen im Sphäroidmodel

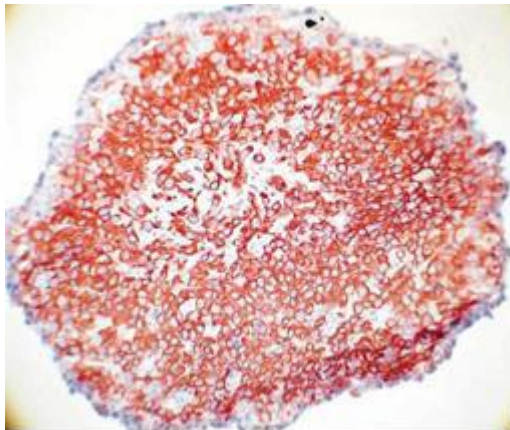
Die Invasion wurde nach 24- und 36- Stunden nach Kokultivierung analysiert.

Schon nach 24 Stunden konnte eine Hemmung der Invasion durch die Behandlung mit den Medikamenten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, aufgezeigt werden.

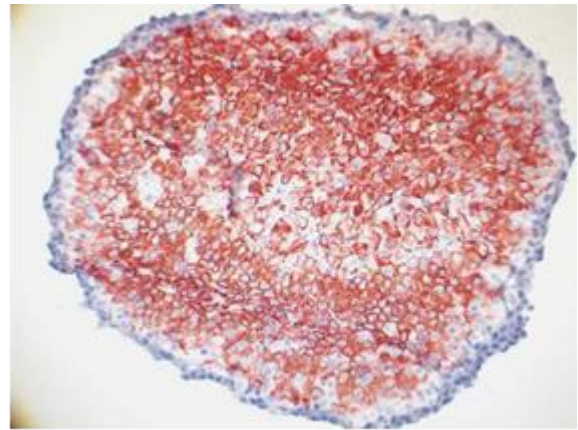
Mit der Dreifachkombinationstherapie konnte eine signifikante Invasionsreduktion erzielt werden. Die HeLa- Zelllinie wurde sogar um über 90 % nach drei Tagen mit der Kombinationstherapie mit WX Uk1, L - Enantiomer (+Celecoxib+Galardin+Wx-Uk1) in Ihrer Invasivität gehemmt. Die anderen Kombinationstherapien zeigten eine geringere aber reproduzierbare und signifikante Invasionshemmung.

Fibroblasten-Sphäroide mit HeLa Einzelzellen d2

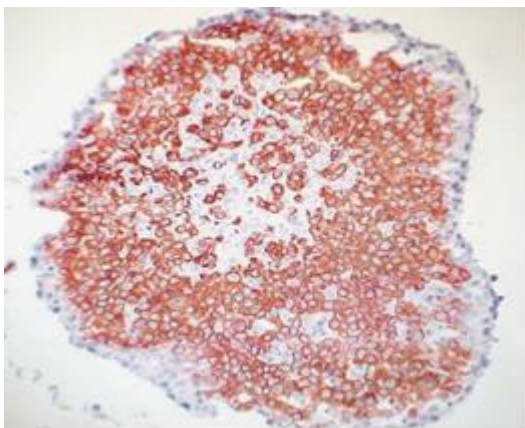
Kontrolle Tag 2



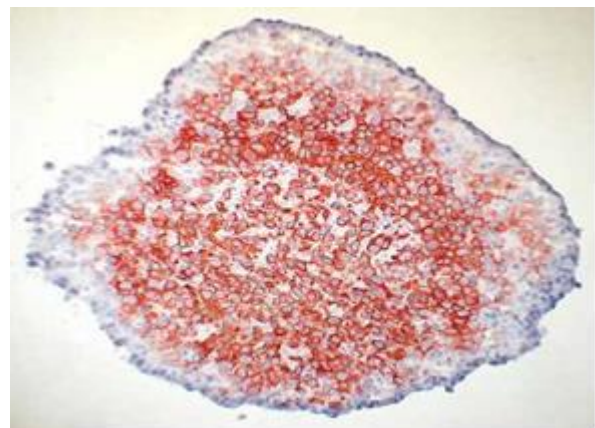
+Celecoxib Tag 2



+Galardin Tag 2



+Celecoxib+Galardin+Wx-Uk1 D Tag 2



+Celecoxib+Galardin+Wx-Uk1 L Tag 2

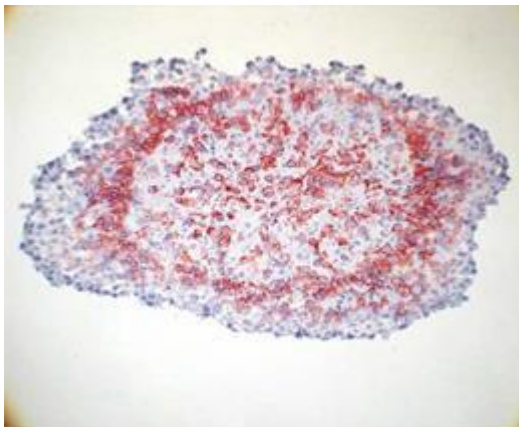
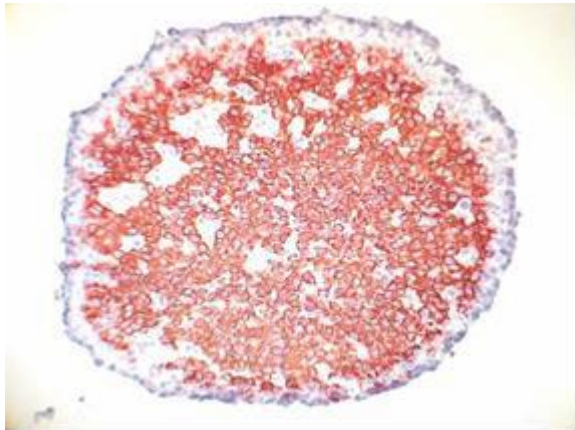
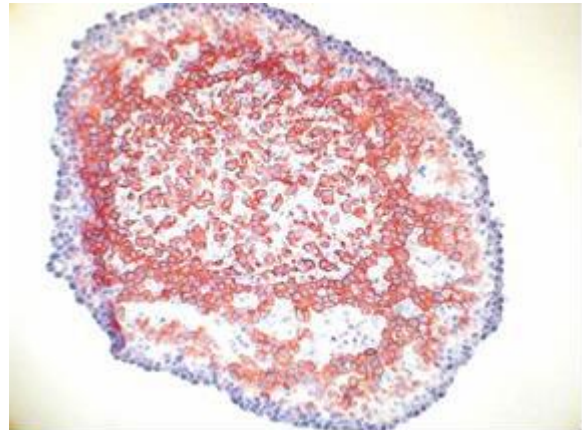


Abbildung 5.1.1: Repräsentative Aufnahmen der HeLa – Zellinvasion (8×10^3) in Fibroblastensphäroide (1×10^4) im Lichtmikroskop nach 24 Stunden. Immunhistochemischer Zytokeratin-Nachweis (mit KL1) von HeLa – Zellen. Ein Teil der Zellen sind ins Sphäroid eingedrungen und sind an der roten Farbe erkennbar (Original-Vergrößerung $\times 200$)

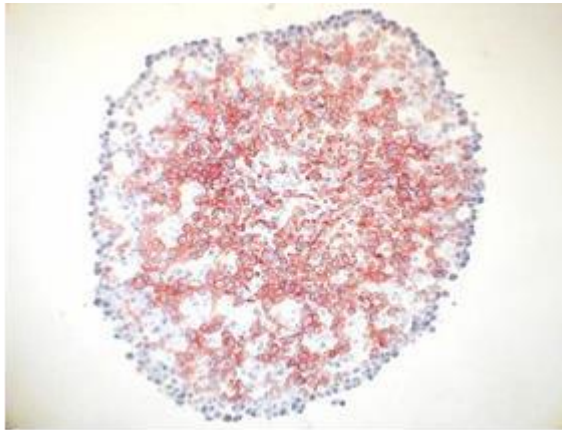
Fibroblasten-Sphäroide+ HeLa Einzelzellen d3
Kontrolle Tag 3



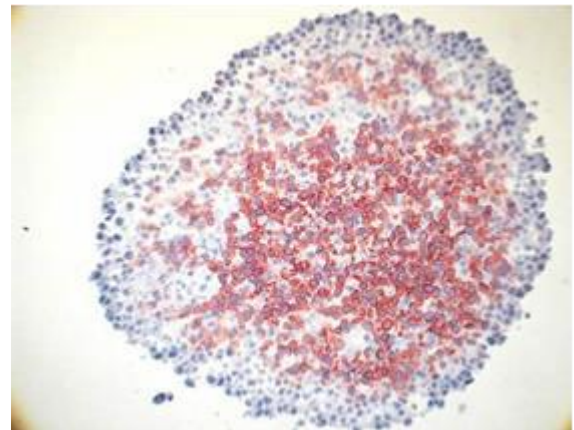
+Celecoxib Tag 3



+Galardin Tag 3



+Celecoxib+Galardin+Wx-Uk1 D Tag 3



+Celecoxib+Galardin+WX-Uk1L Tag 3

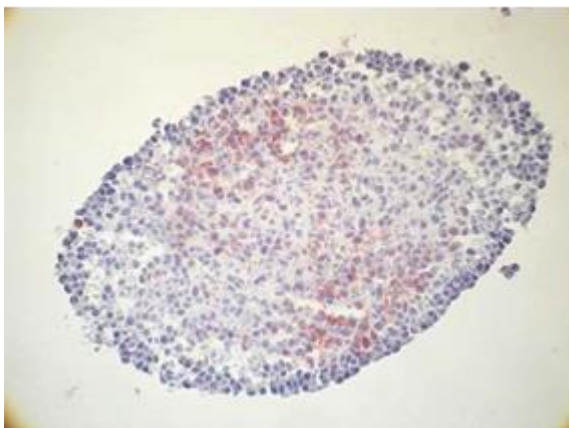


Abbildung 5.1.2: Repräsentative Aufnahmen der HeLa – Zellinvasion (8×10^3) in Fibroblastensphäroide (1×10^4) im Lichtmikroskop nach 36 Stunden.

Immunhistochemischer Zytokeratin-Nachweis (mit KL1) von HeLa – Zellen. Ein Teil der Zellen sind ins Sphäroid eingedrungen und sind an der roten Farbe erkennbar (Original-Vergrößerung $\times 200$)

Invasion von HeLa Zellen in Fibroblasten Sphäroide

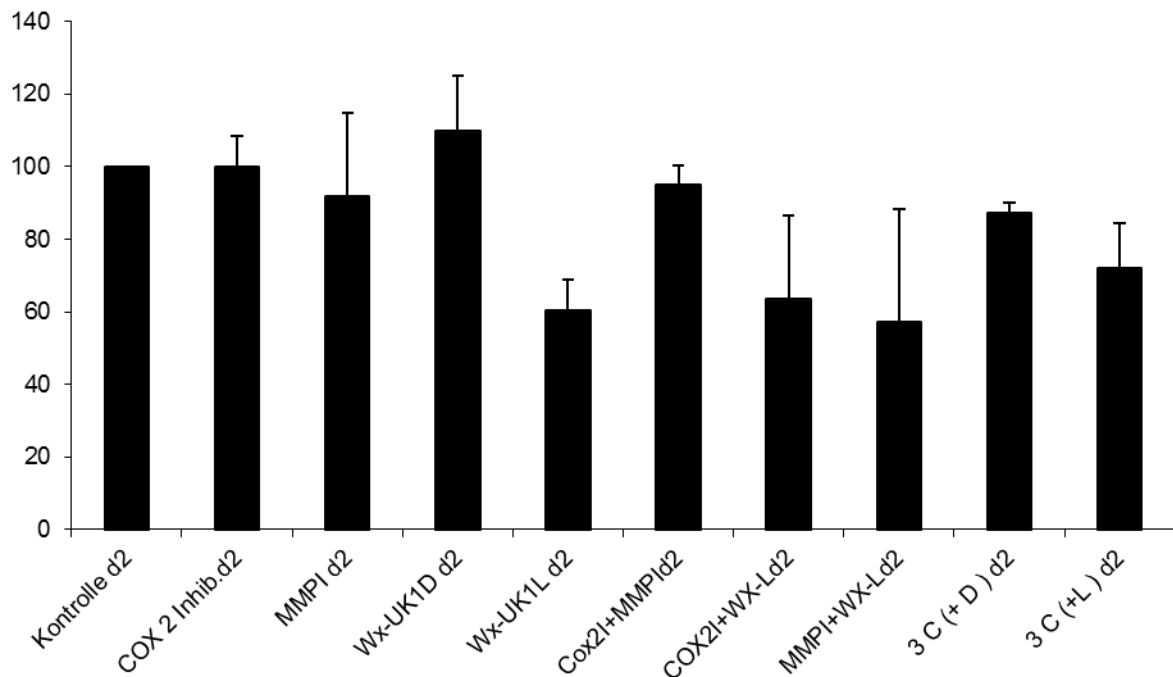


Abbildung 5.1.3: Prozentualer Anteil der invadierten Hela Zellen in Fibroblasten-Sphäroide nach 24-stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamenten

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

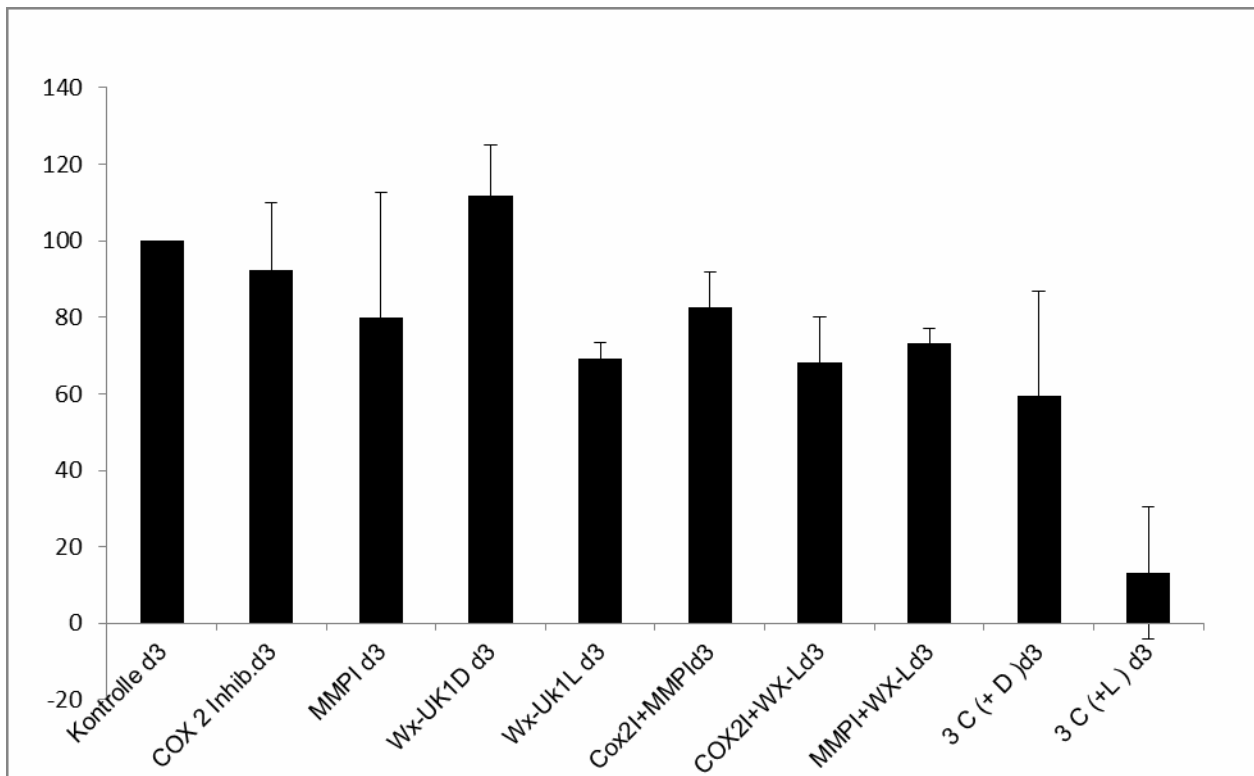


Abbildung 5.1.4: Prozentualer Anteil der invadierten Hela Zellen in Fibroblasten-Sphäroide nach 36-stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamenten

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Invasion von HeLa Zellen in Fibroblasten Sphäroide

	Kontrolle	Cox 2 Inhibitor	MMP Inhibitor	WX-UK1 D-Form	WX- UK1 L- Form	COX2I + MMP I	COX2I + WX-L	MMPI + WX-L	3-er Kombination (WX-D)	3-er Kombination (WX-L)
nach 24-std. Kokultivierung	100%	99,89%	91,73%	110%	60,4%	95,07%	63,56%	57,27%	87,111%	71,92%
nach 36-std. Kokultivierung	100%	92,34%	76,89%	111,9%	69,3%	82,72%	68,12%	73,15%	59,47%	13,22%
p-Wert		0,164 nicht signifikant	≤0,05	0,2 nicht signifikant	≤ 0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,04	≤0,01 hoch signifikant

Abbildung 5.1.5: Prozentualer Anteil der invadierten Hela Zellen in Fibroblasten-Sphäroide nach 24- bzw. 36-stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamenten.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Signifikanz (über den Student t-Test) aus drei unabhängigen Versuchen.

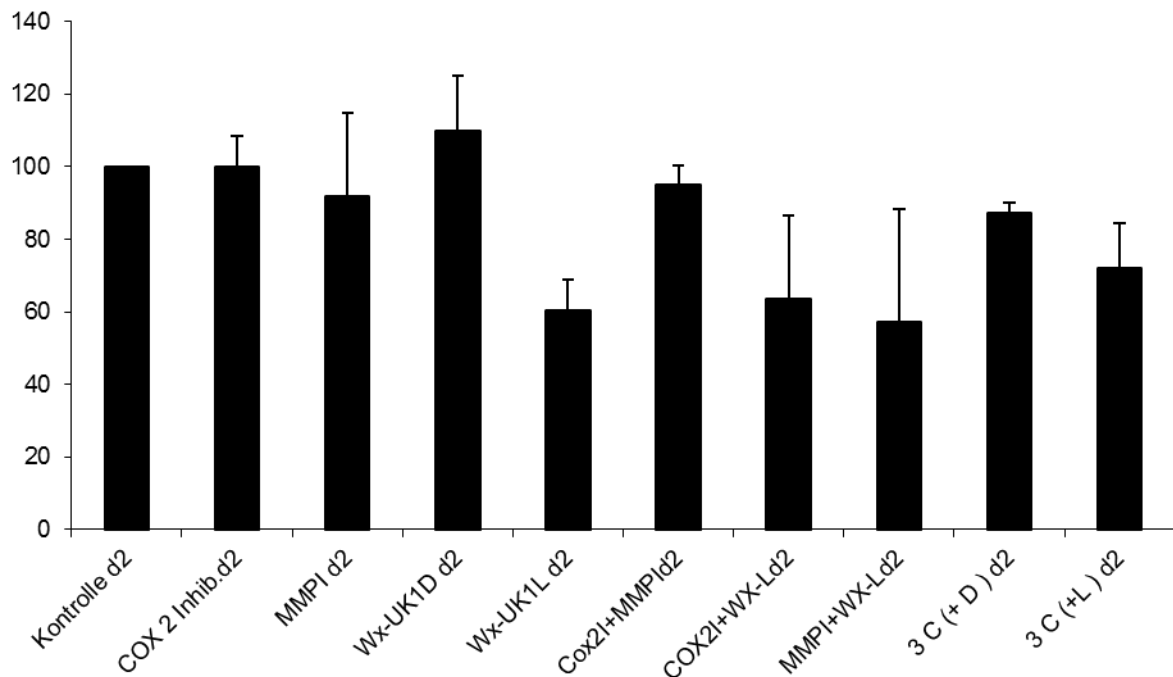


Abbildung 5.1.6: Prozentualer Anteil der invadierten FaDu Zellen in Fibroblasten-Sphäroide nach 24-stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamenten

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

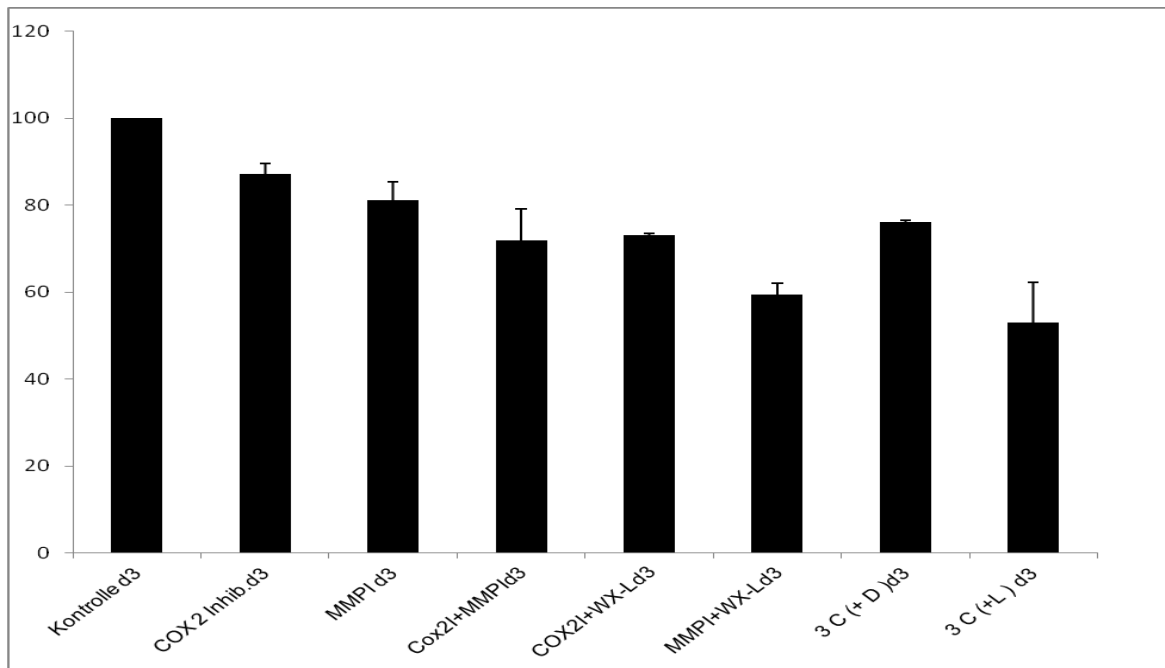


Abbildung 5.1.7: Prozentualer Anteil der invadierten FaDu Zellen in Fibroblasten-Sphäroide nach 36-stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamenten.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

	Kontrolle	Cox 2 Inhibitor	MMP Inhibitor	WX- UK1 D-Form	WX- UK1 L-Form	COX2I + MMP I	COX2I + WX-L	MMPI + WX-L	3-er Kombination (WX-D)	3-er Kombination (WX-L)
nach 24-std. Kokultivierung	100%	96,55%	97,5%	89,32%	75,65%	89,35%	99,56%	92,11%	94,63%	89,0%
nach 36-std. Kokultivierung	100%	87,27%	81,20%	72,76%	70,11%	72,0%	73,2%	59,54%	76,2%	53,0%
p-Wert		nicht signifikant	nicht signifikant	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$ signifikant

Abbildung 5.1.8: Prozentualer Anteil der invadierten FaDu Zellen in Fibroblasten-Sphäroide nach 24- bzw. 36-stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamenten

Dargestellt sind die Mittelwerte und p- Werte (über den Student t-Test berechnet) aus drei unabhängigen Versuchen.

Nach 24 Stunden konnte man im Sphäroidmodell keinen eindeutigen therapeutischen Effekt beobachten.

Unbehandelte HeLa- und FaDu- Zellen zeigten eine starke Invasionskapazität in die Fibroblasten-Sphäroide. Die Kontrolle wurde zum Zweck des Vergleichs auf 100% gesetzt.

Die FaDu- und HeLa-Zellen wurden vor der Inkubation mit den Fibroblasten-Sphäroiden mit Celecoxib®, Galardin®, WX-UK1 und ihren Kombinationen (2-er sowie 3-er Kombination) behandelt. Celecoxib® oder Galardin® alleine haben keine große Wirkung auf die Tumorzellinvasion gezeigt; die Kombination von beiden Medikamenten bewirkt eine Hemmung der Tumorzellinvasion von ca. 20% der HeLa- Zellen und 30% der FaDu-Zellen (Abbildungen 5.1.3-5.1.8).

Die aktive Form der WX-UK1 hat die Tumorzellinvasion um 30% in FaDu- und HeLa-Zellen gehemmt. Die wirksamste Hemmung wurde jedoch mit einer dreifachen

Kombination von WX-UK1(Form L), Galardin® und Celecoxib® erreicht: fast 50% der Tumorzellinvasion der FaDu- und 90% der HeLa-Zelllinie (Abbildungen 5.1.3-5.1.8).

3.5.2 Invasion von HeLa- und FaDu Zellen im Matrigelmodell

Das Experiment zeigte nochmals eindeutig den Einfluss der Kombinationstherapie mit WX – UK 1, L Form auf das Invasionspotenzial der HeLa- und FaDu- Zelllinien.

Die quantitative Analyse mittels Lichtmikroskop zeigte eine 95% Invasionshemmung ($p \leq 0,01$) der HeLa Zellen nach Zugabe der Kombinationstherapie bestehend aus Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$) und L-Enantiomer der WX-UK1 ($1\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine Invasionshemmung der HeLa- Zellen von 25-30% konnte durch die Zugabe der Kombinationstherapie mit WX- UK1, D Form erzielt werden ($p \leq 0,05$). Die Versuche ergaben ähnliche Ergebnisse bei Verwendung der FaDu- Zelllinie.

In diesem Fall erreichte man eine Hemmung der Tumorzellinvasion von 90% ($p \leq 0,01$) nach Behandlung der Zellen mit Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$) und L - Enantiomer der WX-UK1 ($1\mu\text{g/ml}$).

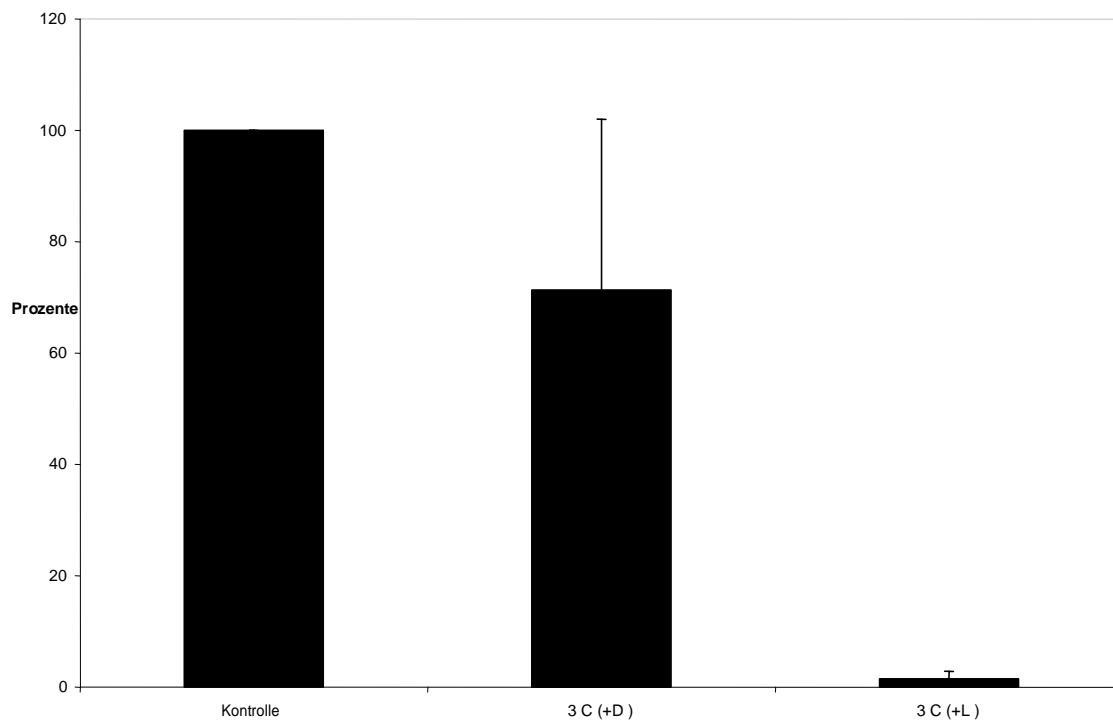


Abbildung 5.2.1: Prozentualer Anteil der invadierten Hela Zellen im Matrigelmodell, nach 36 - stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamente: Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$) und D- und L- Enantiomere der WX-UK1 ($1\mu\text{g/ml}$). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde über den Student t-Test berechnet: $p(3\text{C}(+D)) \leq 0,05$, $p(3\text{C}(+L)) \leq 0,01$

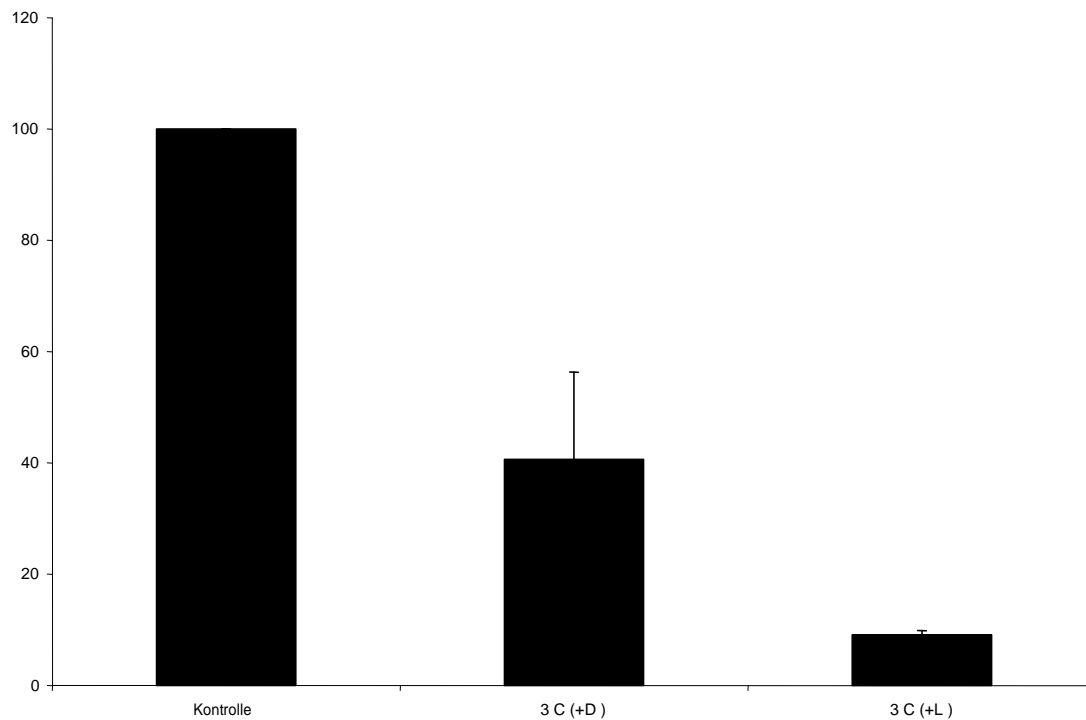


Abbildung 5.2.2: Prozentualer Anteil der invadierten FaDu Zellen im Matrigelmodell, nach 36 - stündiger Kokultivierung ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamente: Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$) und D- und L- Enantiomere der WX-UK1 ($1\mu\text{g/ml}$). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Signifikanz wurde über den Student t-Test berechnet: $p(3\text{C}(+D)) \leq 0,05$, $p(3\text{C}(+L)) \leq 0,01$

Invasion der HeLa Zellen im Matrigelmodell:

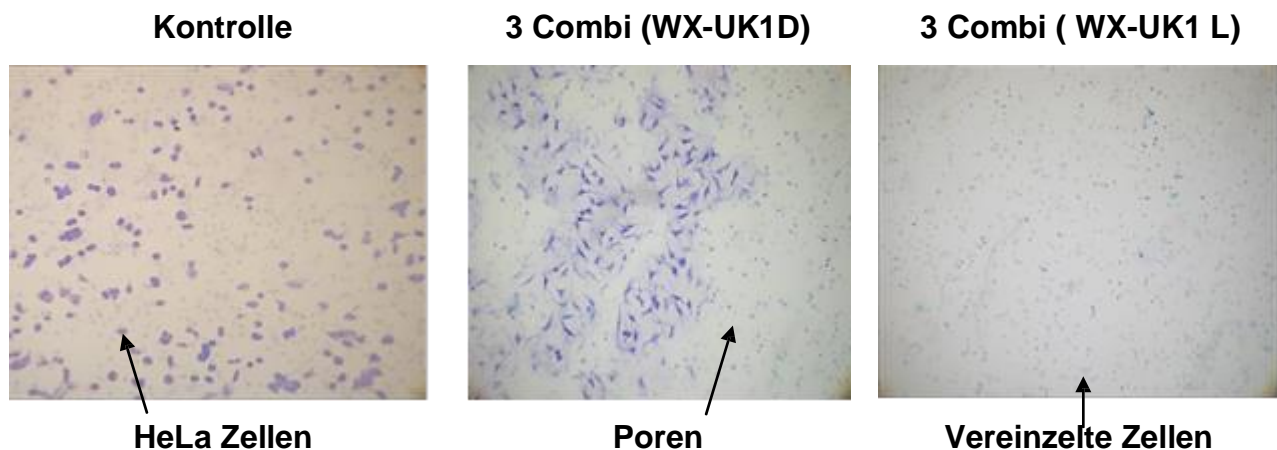


Abbildung 5.2.3: Repräsentative Aufnahmen der HeLa – Zellinvasion (5×10^4 Zellen) ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamente: Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$) und D- und L- Enantiomere der WX-UK1 ($1\mu\text{g/ml}$) im Matrigelmodell nach 36 Stunden nach Fixierung mit Methanol und Färbung mit Toluidinblau.

Invasion der FaDu Zellen im Matrigelmodell:

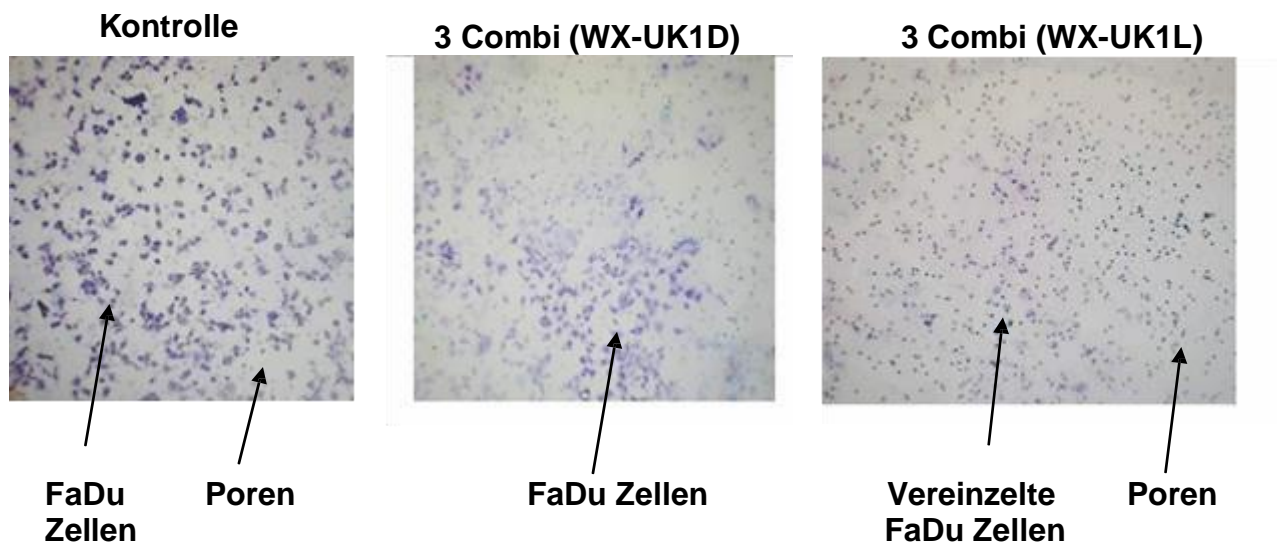


Abbildung 5.2.4: Repräsentative Aufnahmen der FaDu – Zellinvasion (5×10^4 Zellen) ohne (Kontrolle) oder mit Zugabe von Medikamente: Celecoxib ($5\mu\text{M}$), Galardin ($10\mu\text{M}$) und D- und L- Enantiomere der WX-UK1 ($1\mu\text{g/ml}$) im Matrigelmodell nach 36 Stunden nach Fixierung mit Methanol und Färbung mit Toluidinblau.

4 Diskussion:

Die Behandlung von Tumorerkrankungen erfolgt derzeit überwiegend mit den klassischen Methoden. Diese umfassen die chirurgische Tumorentfernung, die zytostatische Chemotherapie und die Strahlentherapie. Insbesondere die Behandlung von fortgeschrittenen, bereits metastasierten Krebserkrankungen weist Grenzen auf.

Hauptverantwortlich für die schlechte Prognose von Tumoren sind die okkulten, im Körper verbleibenden Tumorzellen, die zu lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen führen können (Wollenberg et. al, 2004).

Die medikamentöse Therapie von HNO-Tumoren hat in den vergangenen 15 Jahren enorm an Bedeutung gewonnen. Bis zu den 90iger Jahren kam die zytostatische Chemotherapie lediglich bei inoperablen Rezidivtumoren oder Vorliegen von Fernmetastasen zum Einsatz. Im Gegensatz dazu ist die Chemotherapie heute nicht nur in der palliativen Situation, sondern auch -im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte- vor allem bei Wunsch nach Organerhalt oder bei Vorliegen eines hohen Rezidivrisikos nach Resektion etabliert. Neue tumorbiologische Erkenntnisse ermöglichten in den letzten Jahren eine Weiterentwicklung der therapeutischen Optionen. Wichtig war der Nachweis der EGFR- Expression in 90-100% aller Kopf-Hals-Tumoren (R.Grandes et al.,1998; Temam S et.al., 2007). Mit dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab wurde ein zielgerichtet wirkendes Molekül entwickelt, der in der Behandlung von Rezidiv- und lokal fortgeschrittenen Tumoren zugelassen wurde.

Die Fähigkeit zur Metastasierung erfordert eine Vielzahl verschiedener Mechanismen. Tumorzellen müssen die extrazelluläre Matrix des gesunden Zellnetzwerks enzymatisch auflösen, um sich ausbreiten zu können. Hier spielen lösliche und membranständige Proteasen eine wichtige Rolle (Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ).

Die Endothelzellen setzen verschiedene Enzyme frei, wie die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) und den Urokinase ähnlichen Plasminogenaktivator, die das Matrixgewebe abbauen und dadurch die Ausbreitung der Tumorzellen in die Matrix und darüber hinaus ermöglichen. Neu entstandene Gefäße schaffen die Basis für die Metastasierung, weil die zunehmende Endotheloberfläche den Tumorzellen mehr Gelegenheit bietet, die Zirkulation zu erreichen. In diesen Fällen erlaubt die Dichte der Mikrogefäße eine Aussage über die biologische Aggressivität des Tumors und dadurch über Prognose, Metastasierungs- und Rezidivneigung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine möglichst effiziente und nebenwirkungsarme Therapie zur Inhibierung der Tumorzellinvasion und Tumorangiogenese und somit die Hemmung des Tumorwachstums und seiner Metastasierung untersucht.

4.1 Expression der Matrixmetalloproteasen (MMP) in HeLa- und FaDu - Zellen

Zur Überprüfung des Expressionsprofils von Matrixmetalloproteinasen (MMP`s) bei den HeLa- und FaDu- Tumorzellen wurde eine Durchflußzytometrie durchgeführt.

Aussagen über die Rolle der MMP1 bei Tumordinvasion basieren hauptsächlich auf der Beobachtung hoher MMP- Expression in invasiven malignen Tumoren (Bassed P. Okada A. Et. al, 1997; Johnsen M., Lund L.R. et. al.,1998).

Das Ergebnis zeigte eine eindeutige Lokalisation von MMP-1 an der Zelloberfläche von HeLa- Zellen und MMP-1 und -3 Expression an der Oberfläche von FaDu- Zellen. Jedoch zeigte sich eine fehlende Expression für proMMP-1, MMP-2 und -9.

Die Überproduktion einer Reihe von Metalloproteasen durch Tumorzellen ist maßgeblich für die infiltrativen Wachstumseigenschaften des Tumors verantwortlich (C. Simon et. al., 2001).

Die Collagenasen, zu denen MMP-1 zählt, degradieren spezifisch fibrilläres Kollagen der Typen I, II, III und V und werden von den unterschiedlichsten Zellen exprimiert. Bei Kolon- und Ösophaguskarzinomen korreliert MMP-1 mit einer schlechten Prognose (Murray et. al 1996 u. 1998), beim invasiven Karzinom der Cervix uteri konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von MMP-1 und einer zunehmenden Invasivität gezeigt werden (Brummer et. al. 1999 und 2002). Eine erhöhte MMP-3 Expression verstärkt die transendotheliale Migration (Eum et. al., 2006).

Die Expression von MMPs korreliert direkt mit einem hohen Invasionspotential der untersuchten Zellen (A.R. Folgueras et. al). Hinweise auf die Aktivität bestimmter MMP`s in Tumorgewebe in vivo existieren kaum (Westermarck J., Kähäri V.,1999).

4.2 COX 2 - Expression in Cervixkarzinom- (HeLa) und Hypopharynxkarzinom-Zellen (FaDu)

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels RT-PCR eine COX 2-Expression in HeLa- und FaDu-Zellen nachgewiesen.

Zahlreiche Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von NSAIDs und einem dadurch signifikant reduzierten Risiko hin, an bestimmten Karzinomen zu erkranken. Studien mit Aspirin, Sulindac oder Ibuprofen bei Tieren zeigten, dass die Langzeitapplikation dieser Mittel das Tumorwachstum inhibierten, oder zumindest verzögerten (Ding et al., 2005). Klinische Studien an Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) belegten eine Verminderung der Zahl von Polypen nach Einnahme von Sulindac (Giardelli et al., 1993). In einem Tiermodell erwies sich die spezifische Inhibierung von COX-2 als noch effizienter (Oshima et al., 1996).

Aus diesem Grund sind die Nicht Steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) für Onkologen interessant, wobei von Vorteil wäre, COX-2 spezifische-Hemmer (z.B Celecoxib) im Sinne einer Chemotherapie einzusetzen, um die unerwünschten Nebenwirkungen nicht-selektiver COX-Hemmer (gastrointestinale Nebenwirkungen) zu vermeiden.

Bei Langzeitanwendung selektiver COX-2-Inhibitoren zeigte sich jedoch, zum Beispiel bei Rofecoxib, ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Singh, 2001). Aktuelle Studien zeigen dieses erhöhte Risiko auch für zahlreiche ältere, nicht selektive, nicht steroidale Antiphlogistika wie Indomethazin oder Diclofenac (Singh, 2005).

Da COX-2, neben verschiedenen anderen Tumoren, auch im Zervixkarzinom (Gaffney et. al 2001, Kurkarni et al. 2001) und HNO – Tumoren (Bergmann et. al., 2008) erhöht ist, rechtfertigt dies eine Evaluation von NSAIDs als mögliche therapeutisch wirksame Substanzen bei diesen Tumorarten.

4.3 Einfluss von Celecoxib, Galardin, WX-UK1 (D und L Form) auf die Vitalität der HeLa, FaDu und Fibroblasten-Zellen (MTT-Assay)

In der vorliegenden Arbeit sollte die mögliche invasionshemmende Wirkung des Celecoxib, Galardin und WX – UK1 (Enantiomere D und L) in einer zweifach und dreifach Kombination in vitro auf Cervix- und Hypopharynxkarzinomzellen erforscht werden.

In den von uns durchgeführten in vitro Versuchen mit drei unterschiedlichen Zelllinien, darunter zwei Tumorzelllinien, konnten wir unter definierten Bedingungen (Inkubation über 5 Tagen, 10 % FCS, n=3) eine nicht zytotoxische Dosis der Kombinationstherapie ermitteln. Ertongour et. al. verglichen verschiedene WX- UK1 Dosen. Dabei wurde für die Kombinationstherapie eine nicht zytotoxische Dosis des Serinproteasehemmers WX-UK1 (1µg/ml) ausgewählt. Es wurde eine niedrige Dosis von 5µM Celecoxib ausgewählt, da diese nicht wachstumshemmend wirkt. Han et al. beschrieben dass man sehr hohe Konzentrationen benötigte um eine Wachstumshemmung auszulösen (Han et. al., 2004). Die Konzentration von Galardin wurde als 10µM ausgewählt.

Mittels MTT – Assay wurde die Proliferation der Fibroblastenzellen, HeLa- und FaDu-Zelllinien durch Zugabe von Medikamenten als Einzel- und Kombinationstherapie überprüft und diejenige Dosis der Kombinationstherapie ausgewählt, die keinen zytotoxischen Effekt verursacht (s.o.).

4.4 Migration

Das Migrationsverhalten der Zellen wurde in Zellkulturexperimenten untersucht. Die Wanderung der Tumorzellen über das Endothel sowie die Invasion in die extrazelluläre Matrix sind entscheidende Schritte bei der Metastasierung. Der Vorteil von dem eingesetzten in vitro Versuch ist, dass sich die Zahl der beteiligten Variablen auf ein Minimum reduzieren lässt und es deshalb möglich ist, ausgewählte Aspekte wie Transmigration oder Invasion isoliert zu untersuchen (Brandt et. al., 2005). In vitro Versuche sind statisch und nicht dynamisch, und es fehlen die normalerweise in den Blutgefäßen vorhandenen Scherkräfte aber viele der bisher in vitro gefundenen Daten konnten in vivo bestätigt werden (Orr et. al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zellen transmigrierend waren, eine Behandlung mit der o.g Kombination mit WX- UK1 Enantiomer L bewirkte nur eine minimale Hemmung der Migration von < 10%. Allerdings ist anzumerken dass bei den untersuchten Zelllinien die Zahl der transmigrierten Zellen in der Kontrolle und ebenfalls nach Behandlung sehr hoch war. Das deutet auf ein hohes Invasionspotential der untersuchten Zellen hin.

Es scheint dass die untersuchten Tumorzelllinien die benötigten Faktoren besitzen um in eine Kollagenmatrix einzuwandern.

uPA unterstützt vermutlich die Invasion unter anderem durch Spaltung von Plasminogen zu Plasmin, da dieses zum Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix beiträgt. Plasmin kann Wachstumsfaktoren aktivieren, z. B der β - Wachstumsfaktor, der Interaktionen in der Enzymexpression sowie Neoangiogenese modulieren kann (Shihui Liu, T. Bugge, S. H. Leppla, 2001).

UPAR und uPA sind in vielen malignen Tumoren wie monozyten- und myeloische Leukämien, Tumoren des Dickdarms, der Brust, der Blase, der Schilddrüse, der Leber, Lunge, Pankreas, Ovarien sowie Kopf und Hals überexprimiert (Nielsen B.S., Sehested M., Timshel S., Pyke C, Dano K, 1996).

WX-UK1, ein uPA- Inhibitor hat eine Phase Ia-Studie an gesunden Probanden erfolgreich abgeschlossen. Zudem wurden zwei europäische Phase Ib-Studien mit WX-UK1 als Monotherapie bei Krebspatienten erfolgreich durchgeführt; die eine davon bei Patienten mit soliden Tumoren (Pankreaskarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom etc.), die andere bei Patienten mit Kopf-/Hals-Tumoren (Journal of Clinical Oncology, 2010).

Auch eine Kombinationstherapie mit WX-UK1 in Kombination mit dem oralen Chemotherapeutikum Capecitabine wurde erfolgreich in einer klinischen Phase I-Studie abgeschlossen. Sie wurde in den USA am Fox Chase Cancer Center in Philadelphia mit Patienten mit fortgeschrittenen metastasierten Tumoren durchgeführt und zeigte bei einigen Patienten vielversprechende Wirkungen: so konnten Hinweise für ein verlängertes stabiles Krankheitsbild beobachtet werden und bei drei Patienten, davon zwei Patienten mit metastasiertem Brustkrebs, zeigte sich sogar ein partielles Ansprechen (L. J. Goldstein, S. M. Stemmer et.al., Journal of Clinical Oncology, 2010 ASCO).

Nach Abschluss der Phase I-Studien mit WX-UK1 in verschiedenen Indikationen wurde entschieden, weitere klinische Studien des uPA-Programmes mit dem oral verfügbaren Inhibitor MESUPRON® weiterzuführen. Die orale Vergabe von MESUPRON® stellt einen deutlichen Vorteil für den Patienten dar (M. Schmitt, N. Harbeck et.al., 2011).

4.5 Invasion

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Medikamente auf die Invasivität haben, wurden Invasionsmodelle konzipiert. Auf die Motilität hat die gewählte Medikamentenkombination einen nicht signifikanten Einfluss.

4.5.1 Charakterisierung des Invasionsverhaltens von Tumorzellen in Sphäroid- und Matrigelmodell in Anwesenheit von Medikamenten

Das zweidimensionale System der adhärent wachsenden Monolayer-Zellkulturen liefert für viele Fragestellungen wertvolle Ergebnisse. Von den Gegebenheiten in vivo ist ein solches System jedoch weit entfernt und somit die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert. Näher an der Realität ist das dreidimensionale Modell der Sphäroide, das in der onkologischen Forschung das am häufigsten verwendete dreidimensionale Tumormodell darstellt. Sphäroide sind das in vitro Modell für nicht vaskularisierende disseminierte Tumorzellen und intravaskuläre Regionen solider Tumoren und sind daher in vielen Eigenschaften Geweben in vivo vergleichbar. Gleichzeitig erlauben Sphäroide aber Untersuchungen in einem weniger komplexen und zuverlässig reproduzierbaren Rahmen (Kunz-Schughart et al., 1998). So wurden Sphäroide für die Testung antitumoralen Therapien wie z.B Bestrahlung (Santini et al., 1999), Radioimmuntherapie (Essand et al., 1995) ebenso eingesetzt wie für Untersuchungen zur Wirksamkeit verschiedenen Therapien (Gabler et al., 1997, Fracasso und Columbatti, 2000).

Besondere Bedeutung haben die Sphäroide für die Tumorforschung, da Tumorzellen in Sphäroide aus verschiedenen Zelllinien kultiviert werden können, dementsprechend

unterschiedlich sind auch deren Eigenschaften. Es ließen sich aber auch gemeinsame Merkmale der Sphäroidzellen beobachten. Sie sind generell resistenter gegenüber einer Behandlung mit antitumoralen Substanzen (Desoize und Jardillier, 2000), vermutlich aufgrund interzellulärer Kontaktstrukturen in Form von Desmosomen oder tight junctions (Ballangrud et al., 1999; Lian et al., 1999).

Innerhalb der Sphäroidverbandes zeigen die Zellen spezielle morphologische Differenzierungen: im Zentrum lässt sich ein kleiner Kern nicht proliferierender Zellen nachweisen (Freyer, 1998), der sich nach fünf Tagen nekrotisch zersetzt. Die äußeren Zellen weisen Mitosen auf (Desoize et al., 1998).

Sauer et al. zeigten 1998, dass es einen Gradienten in der metabolischen Aktivität von Sphäroid-Zellen gibt, und zwar ist die Mitochondrienaktivität um so niedriger, je tiefer die Zellen im Sphäroid gelegen sind (Freyer, 1998). Sphäroid-Zellen weisen eine differenzielle Expression verschiedener Proteine mit funktioneller Bedeutung auf (z.B. Adhäsionsmoleküle und proliferationsassoziierte Proteine; LaRue et al., 1998; Rainaldi et al., 1999).

Tumorzell-Sphäroide sind keine homogene Gebilde sondern weisen eine komplexe Struktur von Zellen mit unterschiedlicher Aktivität auf: eine regere Aktivität und Teilung in den peripheren Zellschichten und eine Verminderung der Aktivität bis hin zum nekrotischen Zerfall, je tiefer sich die Zellen im Sphäroid befinden; all die Daten der Literatur stimmen mit den von uns verwendeten Zellsphäroiden überein.

Ertongour et. al. (2004) supprimierten mit WX – UK1, L Enantiomer in der HeLa und FaDu – Zelllinien die in vitro Invasion um 45%.

Über das Infiltrationsverhalten von Tumorzellen in Fibroblasten- Sphäroiden gibt es in der Literatur nur wenige Daten.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Hemmung der Tumorzellinvasion durch die alleinige Behandlung der Zellen mit einem MMP-Inhibitor (Galardin) oder mit dem COX-2 Inhibitor, Celecoxib beobachtet. Hiermit werden Daten in der Literatur widersprochen (K. Dano et. al., 2009; Coussens LM et. al., 2002).

Genmanipulierte Tiere, die gezielt im Brustgewebe große Mengen des Enzyms Cyclooxygenase exprimieren, entwickeln sehr häufig Mammakarzinome. Im Umkehrschluss konnten Wissenschaftler zeigen, dass Tiere ohne intaktes COX-2-Gen, die das Enzym somit nicht produzieren können, vor Krebs geschützt sind: COX-2-Knock-out-Mäuse entwickelten nach chemischer Reizung 75 Prozent weniger Hautpapillome als

Kontrolltiere (Williams CS, Watson AJ, Sheng H, Helou R, Shao J, and DuBois RN, 2000).

Auch pharmakologische Daten sprechen dafür, dass das Isoenzym an der Tumorgenese beteiligt ist. Die selektiven COX-2-Hemmer Celecoxib und Rofecoxib unterdrücken in Tierversuchen die Bildung von Tumoren in Dünndarm, Brust, Lunge, Haut, Zunge und Blase. Weiterhin bremsen sie das Wachstum bereits bestehender Geschwülste in verschiedenen Organen wie Kopf, Lunge, Brust, Dickdarm, Magen und Prostata. Kwak et al. beschreiben 2007 eine Hemmung der Tumordinvasion um ca. 40% nach Behandlung mit Celecoxib. Allerdings wurde mit YD 10B Zellen experimentiert.

In einer anderen Literaturquelle wurde die Radiosensibilisierung verschiedener Tumorzellen nach Behandlung mit Celecoxib untersucht (Diettmann et. Al., 2007).

Die Behandlung mit Celecoxib führte zu einer deutlicheren Erhöhung der Radiosensibilisierung der Zellen A549 (Bronchialkarzinomzellen), HCT116 (Kolonkarzinomzellen) sowie HSF7 (normale Fibroblasten). Auf FaDu- und HH4dd Zellen (transformierte Fibroblasten) wurde dagegen keine Beeinflussung der Radiosensibilisierung nach der Therapie mit Celecoxib festgestellt.

Eine weitere Studie zeigte, dass die Hemmung der Tumorzellinvasion COX-2 unabhängig sei (Williams CS et. al), was möglicherweise die Abweichung in Inhibierung verschiedener Tumorzellen erklärt.

Celecoxib oder Galardin alleine haben keine relevante Wirkung auf die Tumorzellinvasion gezeigt; die Kombination von beiden Medikamenten brachte eine Hemmung der Tumorzellinvasion von ca. 20% der HeLa- Zellen und 30% der FaDu-Zellen (Abbildungen 5.1.3-5.1.8, Ergebnisse).

Die aktive Form (L) der WX-UK1 hat die Tumorzellinvasion um 30 % in FaDu- und HeLa-Zellen gehemmt. Die Behandlung der FaDu- und HeLa-Zellen mit der Dreifach-Kombination scheint eine synergistische Wirkung zu haben: die Hemmung der Tumorzellinvasion war über 50% in der FaDu Zelllinie und erreichte bis 95% bei den HeLa Zellen am dritten Tag.

Im Matrigelmodell erreichten wir eine signifikante Invasionshemmung der HeLa- Zellen durch die Kombinationstherapie mit WX- UK1, L Form um ungefähr 95% sowie eine Hemmung der Tumorzellinvasion von 90% nach Behandlung der FaDu- Zellen.

Daher ist die Verwendung von WX-UK1, Galardin, und Celecoxib als Kombinationstherapie potenter als Einzeltherapie bzw. zweifach-Kombination und zeigte sogar synergistische Effekte.

5 Zusammenfassung

Hauptverantwortlich für die schlechte Prognose von Tumoren sind die okkulten, im Körper verbleibenden Tumorzellen, die zu lokoregionären Rezidiven und Fernmetastasen führen können (Wollenberg et. al, 2004).

Ab einem Gewebedurchmesser von $2\text{-}3\text{mm}^3$ kann ein Tumor nicht mehr durch reine Diffusion versorgt werden, deshalb sprießen in einem Prozess, den man als Neoangiogenese bezeichnet, Kapillaren in den Tumor ein, um so die nutritive Versorgung zu gewährleisten. Viele Tumorzellen produzieren bestimmte Eiweißstoffe, sogenannte Wachstumsfaktoren, die das Gefäßwachstum stimulieren. Neben dem Epithelialen Wachstumsfaktor (EGF), Interleukin 8, Prostaglandine E1 und E2, Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha, G-CSF sind v.a Fibroblastenwachstumsfaktoren und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) hervorzuheben. Durch die Aktivierung der VEGF-Rezeptor assoziierten Tyrosinkinase wird intrazellulär eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Unter anderem kommt es zur Expression von Metalloproteasen und den urokinase-Plasminogen Aktivator System-Komponente, woraufhin sich die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran auflösen.

Eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase 2 (COX 2), Matrixmetalloproteasen (MMP), und dem urokinase-Plasminogen Aktivator System korreliert mit zunehmender Malignität und schlechter Prognose.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine möglichst effiziente und nebenwirkungsarme Therapie zur Inhibierung der Tumorzellinvasion und Tumorangiogenese und somit die Hemmung des Tumorwachstums und seiner Metastasierung evaluiert.

Eine Kombination aus WX-UK1 ein uPA-System Inhibitor, Celecoxib ein COX-2-Inhibitor und Galardin ein Hemmer der Matrixmetalloproteasen wurde verwendet, um das antitumorale Potential zu steigern. Mittels Durchflußzytometrie (FACScan) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde die Enzymexpression bestimmt.

Die Hemmung der Tumorzellinvasion wurde in zwei unabhängigen Modellen analysiert: im Sphäroid- sowie im Matrigelmodell.

Sphäroide sind in-vitro dreidimensionale Modelle die Analogien zur in-vivo Situation zeigen. Hierzu wurden Tumorzellen mit Fibroblastensphäroide mit und ohne Zugabe von Medikamenten kokultiviert. Die bildliche Darstellbarkeit der in die Sphäroide invadierten Tumorzellen wurde durch mikroskopische Methoden nach der Anfärbung der Tumorzellen überprüft und quantifiziert.

Die aktive Form (L) der WX-UK1 hat die Tumorzellinvasion um 30% in FaDu- und HeLa-Zellen gehemmt. Die Behandlung der FaDu- und HeLa-Zellen mit der Dreifach-Kombination scheint eine synergistische Wirkung zu haben: die Hemmung der Tumorzellinvasion war über 50% in der FaDu Zelllinie und erreichte bis 95% bei den HeLa Zellen am dritten Tag.

Desweiteren wurde das Matrigelmodell verwendet, bei dem Tumorzellen in spezielle Gefäße inkubiert wurden in deren Mitte sich eine Kollagenmatrix befand. Diese Kollagenmatrix entspricht der Bindegewebs-Situation im menschlichen Körper. Die Medikamente wurden in Kombination angewendet. Im Lichtmikroskop konnten die, durch die Kollagenmatrix invadierten Zellen, ausgezählt und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle quantifiziert werden. Im Matrigelmodell erreichten wir eine signifikante Invasionshemmung ($p \leq 0,01$) der HeLa- Zellen durch die Kombinationstherapie mit WX-UK1, L Form um ungefähr 95% sowie eine Hemmung der Tumorzellinvasion von 90 % nach Behandlung der FaDu- Zellen.

Die Behandlung durch die Gabe von anti-angiogenetischen Medikamente kann aufgrund der nebenwirkungsarmen Therapie ein klinischer Erfolg sein.

6 Literaturverzeichnis

1. National Institute for Occupational Safety: NIOSH Safety and Health Topic: Occupational Cancer. Februar 2010.
2. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.
3. T. D. Collen, R. Winterhalder, J. Diebold: HPV bei HNO- Tumoren (2011)
4. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruse S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML (2011). Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *The Journal of Clinical Oncology*
5. Bonner et. al: Cetuximab plus Radiotherapy for Head and Neck Cancer (2006)
6. Chau I und Cunningham D: Cyclooxygenase inhibition in cancer – a blind alley or a new therapeutic reality? *N Engl J Med* (2002)
7. Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M: The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009.
8. V. Heinemann, M. Ebert, T. Pinter, P. Bevan, N. Neville, C. Mala, Aladar Megyei Oktató Kórház: ASCO 2010 Randomized Phase II trial with an uPA inhibitor (WX-671) in patients with locally advanced non-metastatic pancreatic cancer
9. K.K. Ang, Q. Zhang, D.I. Rosenthal, P. Nguyen-Tan, E.J. Sherman, R.S. Weber, J. M. Galvin, D.L. Schwartz, A.K. El-Naggar, M.L. Gillison, R. Jordan, M.A. List, A. A. Konski, W.L. Thorstad, A. Trotti, J.J. Beitler, A.S. Garden, W.J. Spanos, S. Yom, R.S. Axelrod: A randomized phase III trial (RTOG 0522) of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III-IV head and neck squamous cell carcinomas (HNC).
10. Evaluation of COX-2, EGFR and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. *Exp Mol Pathol* 2010
11. Higashi Y, Kanekura T, Kanazaki T: Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer*; Smith WL, De-Witt DL, Garavito RM: Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Ann Rev Biochem* (2000)

12. Westermarck J., Kähäri V. : Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion (1999)
13. Basset P, Okada A., Chenard M. et al.: Matrix metalloproteinases stromal effectors of human carcinoma progression (1997)
14. Johnsen M., Lund L.R, Romer J., Almholt K., Dano K.: Cancer invasion and tissue remodelling (1998)
15. Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E et al: [Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]. *Laryngorhinootologie* 2002, 81(7):499-508.
16. Rovinsky YA: Cellular and molecular mechanisms of tumour invasion. *Biochemistry (Mosc)* 1998, 63(9):1029-1043.
17. Strojjan P, Budihna M, Smid L, Vrhovec I, Skrk J: Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in tissue and serum of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer* 1998, 34(8):1193-1197.
18. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM: Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002, 295(5564):2387-2392.
19. Fong D, Steurer M, Obrist P, Barbieri V, Margreiter R, Amberger A, Laimer K, Gastl G, Tzankov A, Spizzo G: Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol* 2006.
20. Sturzebecher J, Vieweg H, Steinmetzer T, Schweinitz A, Stubbs MT, Renatus M, Wikstrom P: 3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg Med Chem Lett* 1999, 9(21):3147-3152.
21. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC: Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994, 368(6470):419-424.
22. Chambers AF, Matrisian LM: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(17):1260-1270.
23. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, 43 Suppl.
24. Hirte H, Goel R, Major P, Seymour L, Huan S, Stewart D, Yau J, Arnold A, Holohan S, Waterfield B et al: A phase I dose escalation study of the matrix

- metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 administered orally in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol* 2000, 11(12):1579-1584.
25. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS: Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999, 5(12):1418-1423.
26. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K, Tsukuda M: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumour growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1999,
27. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997,
28. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Cell* 1997, 15.
29. Ertongur S, Lang S, Mack B, Wosikowski K, Muehlenweg B, Gires O: Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* 2004, 110(6):815-824.
30. Brenner DE: Multiagent chemopreventive agent combinations. *J Cell Biochem Suppl* 2000, 34:121-124.
31. Papadimitrakopoulou VA, Clayman GL, Shin DM, Myers JN, Gillenwater AM, Goepfert H, El-Naggar AK, Lewin JS, Lippman SM, Hong WK: Biochemoprevention for dysplastic lesions of the upper aerodigestive tract. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999, 125(10):1083-1089.
32. Yoshida N, Granger DN, Anderson DC, Rothlein R, Lane C, Kvietys PR: Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1992, 262(6 Pt 2):H1891-1898.
33. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65(1-2):55-63.
34. Wollenberg B, Ollesch A, Maag K, Funke I, Wilmes E: [Micrometastases in bone marrow of patients with cancers in the head and neck area]. *Laryngorhinootologie* 1994, 73(2):88-93.
35. Visvader JE, Lindeman GJ: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008, 8(10):755-768.

36. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1):57-70.
37. Friedl P, Wolf K: Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 2008, 68(18):7247-7249.
38. Wolf K, Friedl P: Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clin Exp Metastasis* 2009, 26(4):289-298.
39. Ossowski L, Reich E: Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumour metastasis. *Cell* 1983, 35(3 Pt 2):611-619.
40. Ullisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M: The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2009.
41. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tschlis PN, Rosen N: Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998.
42. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE: Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996.
43. Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995, 1(1):27-31.
44. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S: Reduced angiogenesis and tumour progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1999.
45. Shalinsky DR, Brekken J, Zou H, Bloom LA, McDermott CD, Zook S, Varki NM, Appelt K: Marked antiangiogenic and antitumour efficacy of AG3340 in chemoresistant human non-small cell lung cancer tumours: single agent and combination chemotherapy studies. *Clin Cancer Res* 1999.
46. Kwak YE, Jeon NK, Kim J, Lee EJ: The cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2007.
47. Boghaert ER, Chan SK, Zimmer C, Grobelny D, Galardy RE, Vanaman TC, Zimmer SG: Inhibition of collagenolytic activity relates to quantitative reduction of invasion in vitro in a c-Ha-ras transfected glial cell line. *J Neurooncol* 1994, 21(2):141-150.
48. Williams CS, Goldman AP, Sheng H, Morrow JD, DuBois RN: Sulindac sulfide, but not sulindac sulfone, inhibits colorectal cancer growth. *Neoplasia* 1999.

49. Williams CS, Mann M, DuBois RN: The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999.
50. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM: Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 2004.
51. Hasegawa K, Ohashi Y, Ishikawa K, Yasue A, Kato R, Achiwa Y, Nishio E, Udagawa Y: Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumour effects of a selective COX-2 inhibitor. *Int J Oncol* 2005.
52. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Gendler SJ, Mukherjee P: Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005.
53. Dannenberg, A. J., et al., Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer, *The Lancet Oncology*, (2) (2001) 544 – 551
54. Gupta, R.A., DuBois, R. N., Colorectal Cancer Prevention and Treatment by Inhibition of Cyclooxygenase-2, *Nature Reviews* (1) (2001) 11 – 21
55. Hwang, D. H., et al., National Cancer Institute Workshop on Chemopreventive Properties of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Role of COX-Dependent and –Independent Mechanisms, *Neoplasia* (4) (2002) 91 – 97
56. Song, X., et al., Cyclooxygenase-2, Player or Spectator in Cyclooxygenase-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells, *Journal of the National Cancer Institute* (94) (2002) 585 – 591
57. Steinbach, G., et al., The Effect of Celecoxib, a Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Familial Adenomatous Polyposis, *New England Journal of Medicine* (2000) 1946 - 1952
58. Magdolen V., Krueger A., Sato S., Nagel J., Sperl S., Reuning U., Rettenberger P., Magdolen U., Schmitt M. Inhibition of the tumor associated urokinase-type plasminogen activation system: effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells in vitro and in vivo. In: *Recent Results in Cancer Research*, Vol. 162, 2003
59. Harbeck N., Kates R.E., Look M.P., Meijer-van Gelder M.E., Klijn J.G.M., Krüger A., Kiechle M., Jänicke F., Schmitt M., Foekens J.A. Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). In: *Cancer Research* 62, 4617-4622, August 15, 2002.

60. Magdolen U., Krol J., Sato S., Mueller M.M., Sperl S., Krueger A., Schmitt M., Magdolen V. Natural inhibitors of tumor-associated proteases. *Radiol Oncol* 2002; 36(2): 131-143.
61. Buergle M., Sperl S., Stürzebecher J., Krüger A., Schmalix W., Kessler H., Moroder L., Magdolen V., Wilhelm O.G., Schmitt M. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system: a new target for tumor therapy. In: Smith H.J., Simons C. (editors), *Proteinase and peptidase inhibition – recent potential targets for drug development*. London, 2002, pp. 231-248

7 Abkürzungsverzeichnis:

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
CIN	Carcinoma in situ
COX	Cyclooxygenase
3C(+D)	Kombinationstherapie (Celecoxib, Galardin, WX-UK1,D Form)
3C(+L)	Kombinationstherapie (Celecoxib, Galardin, WX-UK1,L Form)
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FCS	Fötales Kälberserum
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humanes Papillomavirus
MMP	Matrixmetalloprotease
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polykettenreaktion
t-PA	tissue-type plasminogen activator
TGF	tumor growth factor
UICC	Union internationale contre le cancer
uPAR	urokinase-type plasminogen activator
VEGF	vascular endothelial growth factor

8 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. P. Zengel für die Stellung des Themas und für die umfassende Unterstützung dieser Arbeit. Ihre große Geduld bei der Einarbeitung und Begleitung während der ganzen Zeit sowie die kompetente Planung der Experimente waren für das Gelingen dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires und Frau Dr. S. Schmitz danke ich für die freundliche Unterstützung und für die konstruktiven Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Brigitte Mack und Frau Bärbel Schmitt für ihre Geduld und Mitarbeit.

Dank auch an allen übrigen Mitarbeiter im HNO-Forschungslabor: Herrn C. Kieu, Frau Dr. B.Gonzales, Herrn Dr. M.Münz, Herrn Dr. J.Rauch, Frau Dr. T.Schaffrik. Durch sie war die Arbeit in einer freundlichen Atmosphäre möglich.

10 Eidesstattliche Versicherung

Segmiller Diana

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Multimodale Therapie zur Hemmung der Tumorzellinvasion“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift